(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 813 609**

(51) Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2013 PCT/US2013/075157**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14093908**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2013 E 13843056 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 2931030**

(54) Título: **Polinucleótidos que codifican anticuerpos de roedores con idiotipos humanos y animales que los contienen**

(30) Prioridad:

14.12.2012 US 201261737371 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.03.2021

(73) Titular/es:

OPEN MONOCLONAL TECHNOLOGY, INC. (100.0%)
3911 Sorrento Valley Road, Suite 110
San Diego, California 92121, US

(72) Inventor/es:

BRUGGEMANN, MARIANNE;
BUELOW, ROLAND;
OSBORN, MICHAEL, J. y
MA, BIAO

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 813 609 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

Polinucleótidos que codifican anticuerpos de roedores con idiotipos humanos y animales que los contienen

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos U.S.S.N. 61/737,371 presentada el 14 de diciembre de 2012.

Campo de la invención

La invención se refiere a polinucleótidos, particularmente polinucleótidos quiméricos útiles para la producción de inmunoglobulinas con idiotipos humanos en roedores. La invención se refiere además a células de roedores que comprenden tales polinucleótidos.

Referencia a un listado de secuencias

En este documento de patente se proporciona un listado de secuencias como un archivo txt titulado "189314-US_ST25.txt" y creado el 12 de diciembre de 2012 (tamaño 3MB).

Antecedentes de la invención

Los anticuerpos monoclonales humanos han demostrado ser invaluables en aplicaciones terapéuticas, ya sea como IgG de tamaño convencional, cadenas simples o módulos de dominio[1,2]. A pesar de los éxitos, todavía existen grandes deficiencias en su producción, que se basa en la selección de especificidad del material humano disponible y la posterior modificación de productos individuales, o la inmunización de la disponibilidad limitada de animales transgénicos, principalmente ratones[3]. Las restricciones de antígeno objetivo están ampliamente establecidas para el uso de ratones transgénicos, así como para animales transgénicos grandes como el ganado, y el desarrollo de nuevas especificidades está controlado por la compañía[4-7].

El reordenamiento del ADN y la expresión de genes de inmunoglobulina (Ig) humana en ratones transgénicos fue pionero hace más de 20 años mediante la inserción estable de genes de cadena pesada en la configuración de la línea germinal[8]. Aunque se obtuvieron repertorios de anticuerpos humanos en estos primeros animales, las mejoras importantes, que dieron como resultado niveles de expresión más altos y producción exclusiva de Ig humana, combinaron dos nuevas estrategias: desactivación de genes en células madre embrionarias (ES)[9] y extensión de locus en cromosomas artificiales[10].

El silenciamiento de los genes de Ig endógenos mediante la selección de genes en células ES produjo varias líneas de ratón inactivas sin la capacidad de reorganizar su locus de IgH e Igκ o sin producir productos IgH, Igκ o Igλ completamente funcionales (resumidos en[3]). Más recientemente, las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) se diseñaron para generar rupturas de doble cadena específicas del sitio en los genes de Ig, lo que permitió la ruptura del gen por eliminación y reparación del ADN no homólogo. La inyección de plásmidos de ZFN en óvulos fertilizados produjo ratas y conejos con silenciamiento de Ig con rompimientos de IgH e IgL[11-13].

La expresión eficiente de anticuerpos requiere elementos reguladores funcionales en varias ubicaciones en loci de inmunoglobulina. Las secuencias potenciadoras se han identificado cerca de muchos genes activos por digestión con nucleasas e hipersensibilidad a la degradación. Los sitios hipersensibles pueden preceder a las secuencias promotoras y la intensidad de su actividad se correlacionó con la secuencia de ADN. El enlace con los genes informadores mostró una transcripción elevada si la función potenciadora estaba presente (Mundt et al., J. Immunol., 166, 3315 [2001]). En el locus IgH se han identificado dos importantes reguladores de la transcripción o expresión, Eμ y el 3'E al final del locus (Pettersson et al., Nature, 344, 165 [1990]). En el ratón, la eliminación de toda la región reguladora 3' (que contiene hs3a, hs1,2, hs3b y hs4) permite el desarrollo temprano de células B, pero anula la recombinación de cambio de clase (Vincent-Fabert et al., Blood, 116, 1895 [2010]) y posiblemente impide la optimización de la hipermutación somática (Pruzina et al., Protein Engineering, Design and Selection, 1, [2011]).

La función reguladora para lograr una expresión de isotipo óptima es particularmente deseable cuando se usan genes de IgH humanos transgénicos. Sin embargo, en varios laboratorios, los constructos transgénicos con una región 3'E incompleta, que típicamente proporciona solo el elemento hsl, 2, condujeron a niveles de expresión decepcionantes en ratones transgénicos, incluso cuando el locus de IgH endógeno fue desactivado. Esta puede ser una de las razones por las que la generación de IgG completamente humanas específicas de antígeno a partir de ratones genéticamente modificados ha sido ineficiente hasta el momento (Lonberg et al., Nature 368, 856 [1994]; Nicholson et al., J. Immunol., 163, 6898 [1999]; Davis et al., Cancer Metastasis Rev. 18, 421 [1999]; Pruzina et al., Pritein Engeeniering, Design and Selection, 1, [2011].

El documento WO 2008/151081 (OMT Inc.) describe una rata transgénica que comprende un locus de Ig artificial.

Los documentos WO 2011/004192 y WO 2011/158009 divulgan mamíferos no humanos cuyos genomas comprenden regiones V, D y J humanas para producir anticuerpos que tienen una región constante no humana y una región variable humana.

En la rata, la región 3'E solo ha sido mal analizada. Una comparación de las secuencias de ratones y ratas no permite la identificación de hs4, el cuarto elemento crucial E con secuencias reguladoras adicionales importantes más adelante (Chatterjee et al., J. Biol. Chem., 286, 29303 [2011]). Esto podría significar que la región no está presente en la rata, y quizás no es tan importante como en el ratón, o podría estar ausente en las secuencias analizadas del genoma de la rata.

Aún se necesitan métodos y materiales para la producción óptima de inmunoglobulinas o anticuerpos que tengan idiotipos humanos que usan animales transgénicos, que sean útiles para tratar humanos en una amplia gama de áreas de enfermedad.

Resumen de la invención

En el presente documento se describen nuevos polinucleótidos que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican cadenas de inmunoglobulina quiméricas, particularmente cadenas pesadas quiméricas para usar en la creación de animales transgénicos. Los polinucleótidos de la presente invención proporcionan ventajosamente una expresión óptima debido, al menos en parte, a la inclusión de un potenciador 3' ya que los transloci que carecen de este potenciador 3' dan como resultado un cambio de isotipo deteriorado y una baja expresión de IgG. Por consiguiente, la invención proporciona polinucleótidos quiméricos que comprenden una secuencia potenciadora 3' de rata, un gen de región constante de Ig y al menos un gen de región de unión (J) de inmunoglobulina (Ig) humana. La secuencia potenciadora 3' de rata comprende la secuencia establecida como la SEQ ID NO: 1.

Los polinucleótidos quiméricos establecidos en el presente documento comprenden además al menos un gen variable (V) humano y al menos un gen de diversidad (D). En una realización, el gen de la región constante del polinucleótido quimérico se selecciona del grupo que consiste en un gen de región constante humana y un gen de región constante de rata. En una realización preferida, el gen de la región constante es un gen de región constante de rata. En otra realización preferida, el gen de la región constante se selecciona del grupo que consiste en Cμ y Cγ.

En una realización, el polinucleótido quimérico comprende una secuencia de ácido nucleico sustancialmente homóloga al cromosoma artificial bacteriano (BAC) Annabel divulgado en el presente documento (por ejemplo, la SEQ ID NO: 10), o una porción del mismo, y opcionalmente puede comprender además al menos un gen de Ig variable humano aislable de BAC6-V_H3-11 y BAC3. En una realización preferida, los polinucleótidos quiméricos contemplados en el presente documento comprenden secuencias de ácido nucleico (a) y (b) en orden de 5' a 3': (a) una región variable de Ig humana que comprende genes de V humanos en configuración natural aislables de BAC6-V_H3-11 y/o BAC3, y (b) una región de unión de Ig humana que comprende genes J humanos en configuración natural aislables del BAC Annabel. En otra realización, cada una de la región variable de Ig humana, la región de diversidad de Ig humana, la región de unión de Ig humana, la región constante de Ig y la región potenciadora 3' de rata de un polinucleótido quimérico como el divulgado en el presente documento están en las posiciones relativas como se muestra en la Figura 1a. En otra realización, un polinucleótido quimérico como el divulgado tiene una secuencia que comprende o es sustancialmente homóloga a la secuencia establecida como la SEQ ID NO: 2 o una porción de la misma. En otra realización, un polinucleótido quimérico como el divulgado tiene una secuencia que comprende o es sustancialmente homóloga a la secuencia establecida como la SEQ ID NO: 11, o una porción de la misma. En una realización adicional, un polinucleótido quimérico como el divulgado en el presente documento comprende las regiones V-D-J reorganizadas, en el que dichas regiones V-D-J reorganizadas codifican un exón de dominio variable de cadena pesada.

En el presente documento también se divulgan polinucleótidos que codifican genes de cadena ligera kappa humana. En una realización, un polinucleótido como el divulgado en el presente documento tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende o es sustancialmente homóloga a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en RP11-1156D9 (establecida como la SEQ ID NO: 3) y RP11-1134E24 (establecida como la SEQ ID NO: 4). En otra realización, el polinucleótido aislado comprende secuencias de ácido nucleico (a) y (b) en el orden 5' a 3': (a) una región variable de Ig humana que comprende genes de V humanos en configuración natural aislables de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) RP11-156D9 y/o RP11-1134E24; (b) una región de unión de Ig humana que comprende genes J humanos en configuración natural aislables de los cromosomas artificiales bacterianos (BAC) RP11-1134E24 y/o RP11-344F17 (establecida como la SEQ ID NO: 5). En una realización preferida, cada una de la región variable de Ig humana, la región de unión de Ig humana y la región constante de Ig humana están en posición relativa como se muestra en la Figura 1b. En otra realización, un polinucleótido quimérico como el divulgado tiene una secuencia que comprende o es sustancialmente homóloga a la secuencia establecida como la SEQ ID NO: 6 o una porción de la misma.

También se proporciona en el presente documento una célula de roedor que comprende uno o más polinucleótidos de la invención. Por ejemplo, se proporciona en el presente documento una célula de roedor que comprende un polinucleótido que comprende un polinucleótido quimérico que comprende al menos un gen de región de unión (J)

de inmunoglobulina (Ig) humana, un gen de región constante de Ig y un potenciador 3' de rata. También se describe en el presente documento una célula de roedor que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada quimérica, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia potenciadora 3' de rata, un gen de la región constante de Ig y al menos un gen de la región J humana, y opcionalmente, que comprende una secuencia de ácido nucleico sustancialmente homóloga a la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en RP11-1156D9, RP11-1134E24 y porciones de las mismas. La célula de roedor contemplada en el presente documento puede comprender además un polinucleótido que codifica una cadena ligera funcional, por ejemplo, que tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende o es sustancialmente homóloga a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la secuencia mostrada en la Figura 1b (establecida como la SEQ ID NO: 6), la secuencia mostrada en la Figura 1c (establecida como la SEQ ID NO: 7), y porciones de las mismas. En una realización, uno o más de los polinucleótidos están integrados en el genoma de la célula de roedor.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Loci integrados de Ig humana. (a) La región quimérica de IgH humana-rata contiene 3 BAC que se superpone con 22 segmentos V_H humanos diferentes y potencialmente funcionales. BAC6-3 se ha ampliado con V_H3-11 para proporcionar una superposición de 10.6 kb a BAC3, que superpone 11.3 kb a través de V_H6-1 con la región C de BAC Hu-Rata Annabel. Esta última es quimérica y contiene todos los segmentos D y J_H humanos seguidos por la región C de rata con las secuencias potenciadoras completas. (b) Los BAC de Igk humana con 12 Vk y todos los Jk proporcionan una superposición de ~ 14 kb en la región Vk y ~ 40 kb en Ck para incluir el KDE. (c) La región de Igl humana con 17 Vl y todos los J-Cl, incluido el potenciador 3', es de un YAC[33].

Figura 2: Análisis por citometría de flujo de células de bazo y médula ósea dependientes de linfocitos de ratas de 3 meses de edad. La tinción superficial para IgM y CD45R (B220) reveló un número similar de células B inmaduras y maduras en la médula ósea y el bazo de ratas HC14 y de tipo silvestre, mientras que los animales JKO/JKO no mostraron desarrollo de células B. El gráfico hacia adelante (FSC) contra la dispersión del sitio (SSC) mostró un número comparable de poblaciones de linfocitos (dependientes), en relación con el tamaño y la forma. La tinción de la superficie de las células del bazo con anti-IgG (isotipo G1, G2a, G2b, G2c) graficada contra el recuento celular (x 102) reveló números casi normales de expresadores de IgG+ en ratas HC14 en comparación con las de tipo silvestre. En la médula ósea, A se refiere a células B pro/pre ($CD45R^+$ IgM^-) y B se refiere a células B inmaduras ($CD45R^+$ IgM^+). En el bazo, A se refiere a las células B de transición ($CD45R^+$ IgM^-), B a las células B foliculares ($CD45R^+$ IgM^+) y C a las células B de la zona marginal ($CD45R^{bajo}IgM^+$).

Figura 3: Cambios mutacionales en las transcripciones de IgH e IgL de PBL. Los únicos (VHDJH) y los VL provenían de amplificaciones con cebadores específicos del grupo V: IGHV1, 2, 3, 4 y 6 en combinación con el cebador inverso universal γCH2, IGLV2, 3 y 4 con cebador Cλ inverso; e IGKV1, 3, 4 y 5 con cebador Cκ inverso (Tabla complementaria 1). Se identificaron productos de conmutación transmutados para Cy2a VH-rata humano (4) y Cy2c VH-rata humano (2).

Figura 4: Purificación de Ig de rata con idiotipos humanos y comparación con los niveles de Ig humana y de rata normal. Se usó suero OmniRat y suero de control de tipo silvestre humano o de rata, 100 µL cada uno, para la purificación de IgM/G. (a) Se capturó IgM con matriz anti-IgM, que identificó 14 µg en rata de tipo silvestre, y 30 µg y 10 µg en OmniRat [HC14 (a) y HC14 (c)]. (b) La IgG se purificó en columnas de proteína A y proteína G, con un rendimiento de hasta ~3 mg/mL para OmniRat (Proteína A: HC14 (a) 1000 µg/mL; HC14 (b) 350 µg/mL; rata de tipo silvestre 350 µg/mL; Proteína G: HC14 (a) 2970 µg/mL; HC14 (b) 280 µg/mL; rata de tipo silvestre 1010 µg/mL). (c) Igκ humana y (d) Igλ humana se purificaron en matriz anti-Igκ y anti-Igλ, respectivamente. No se obtuvo ningún producto de purificación usando suero de rata de tipo silvestre (no mostrado). La Ig purificada, ~3 µg (concentración determinada por NanoDrop, se separó en SDS-PAGE al 4-15% en condiciones reductoras. Comparación mediante valoración por ELISA de (e) niveles de Igκ humana y (f) Igλ humana en OmniRat individuales (8531, 8322, 8199, 8486, 8055), suero humano y de rata tipo silvestre. La dilución del suero (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000) se graficó contra la unión medida por adsorción a 492 nm. Los nombres/números coincidentes se refieren a muestras de la misma rata.

Descripción detallada

En este documento se proporcionan polinucleótidos quiméricos que codifican una cadena o loci de inmunoglobulina recombinante o artificial. Como se describió anteriormente, los polinucleótidos quiméricos divulgados en el presente documento son útiles para la transformación de roedores para incluir genes de Ig humana y para la producción de inmunoglobulinas o anticuerpos que tienen idiotipos humanos usando tales roedores.

Polinucleótidos

La inmunoglobulina se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina humana reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, épsilon y mu, así como los

genes de la región variable de inmunoglobulina Myriad. Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 Kd, o 214 aminoácidos) generalmente comprenden un dominio variable codificado por un exón que comprende uno o más genes de región variable y uno o más genes de región de unión en el terminal NH_2 (aproximadamente 110 aminoácidos) y dominio constante codificado por un gen de región constante kappa o lambda en el terminal COOH. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 Kd, o 446 aminoácidos), comprenden de manera similar (1) un dominio variable (aproximadamente 116 aminoácidos) codificado por un exón que comprende uno o más genes de región variable, una o más genes de región de diversidad y uno o más genes de región de unión, y (2) uno de los dominios constantes mencionados anteriormente que comprende uno o más genes de región constante, por ejemplo, alfa, gamma, delta, épsilon o mu (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos). Los genes de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina codifican para la clase de anticuerpo, es decir, el isotipo (por ejemplo, IgM o IgG1).

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que comprende al menos uno, y preferiblemente dos, dominios variables de cadena pesada (H) (abreviados en el presente documento como VH), y al menos uno y preferiblemente dos dominios variables de cadena ligera (L) (abreviados en el presente documento como VL). Un experto en la materia reconocerá que el dominio variable de una cadena inmunológica está codificado en segmentos de genes que primero deben someterse a una recombinación somática para formar un exón completo que codifique el dominio variable. Hay tres tipos de regiones o segmentos de genes que se reorganizan para formar el dominio variable: la región variable que comprende genes variables, la región de diversidad que comprende genes de diversidad (en el caso de una cadena pesada de inmunoglobulina) y la región de unión que comprende genes de unión. Los dominios VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" ("CDR") intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones marco" ("FR"). La extensión de las FR y las CDR se ha definida con precisión (véase Kabat et al., (1991) Sequences of Proeins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU., Publicación de los NIH No. 91-3242; y Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-17, que se incorporan en el presente documento como referencia). Cada dominio VH y VL generalmente está compuesto por tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el terminal amino al terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. El fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento"), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, CD3).

Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos en el término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-46), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, mediante métodos recombinantes, por un conector sintético que les permite formarse como una cadena de proteínas única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242: 423-26; y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también están destinados a estar incluidos en el término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan por su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Un anticuerpo puede incluir además un dominio constante de cadena pesada y/o ligera para formar de ese modo una cadena de inmunoglobulina pesada y ligera, respectivamente. En una realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, en las que las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina están interconectadas, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro. El dominio constante de la cadena pesada está compuesto por tres segmentos de genes, CH1, CH2 y CH3. El dominio constante de la cadena ligera está compuesto por un gen, CL. Los dominios variables de las cadenas pesadas y/o ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Los dominios constantes de los anticuerpos típicamente median la unión del anticuerpo a los tejidos o factores del huésped, incluidas varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

Por polinucleótido que codifica un locus de inmunoglobulina artificial o una cadena de inmunoglobulina artificial se entiende un polinucleótido recombinante que comprende múltiples regiones de inmunoglobulina, por ejemplo, una región variable (V) o segmento génico que comprende genes de V, una región del gen de unión (J) o un segmento génico que comprende genes J, una región de diversidad (D) o segmento de gen que comprende genes D en el caso de un locus de cadena pesada y/o al menos una región constante (C) que comprende al menos un gen C. Preferiblemente, cada región del dominio variable, por ejemplo, región V, D o J, comprende o abarca al menos dos genes del mismo tipo. Por ejemplo, una región variable como se usa en el presente documento comprende al menos dos genes variables, una región de unión comprende al menos dos genes de unión y una región de diversidad

comprende dos genes de diversidad. Una región constante puede comprender solo un gen constante, por ejemplo, un gen κ o gen λ, o múltiples genes, por ejemplo, CH1, CH2 y CH3.

"Secuencias potenciadoras" o "potenciadora" como se usa en el presente documento se refiere a secuencias que se han identificado cerca de muchos genes activos por digestión con nucleasas e hipersensibilidad a la degradación. Los sitios hipersensibles pueden preceder a las secuencias promotoras y la intensidad de su actividad se correlacionó con la secuencia de ADN. El enlace con los genes informadores mostró una transcripción elevada si la función potenciadora estaba presente (Mundt et al., J. Immunol., 166, 3315 [2001]). En el locus de IgH se han identificado dos importantes reguladores de la transcripción o expresión, Eμ y el 3'E al final del locus (Pettersson et al., Nature, 344, 165 [1990]). En el ratón, la eliminación de toda la región reguladora 3' (que contiene hs3a, hs1,2, hs3b y hs4) permite el desarrollo temprano normal de las células B pero anula la recombinación de cambio de clase (Vincent-Fabert et al., Blood, 116, 1895 [2010]) y posiblemente evita la optimización de la hipermutación somática (Pruzina et al., Protein Engineering, Design and Selection, 1, [2011]). La función reguladora para lograr una expresión de isotipo óptima es particularmente deseable cuando se usan genes transgénicos de IgH humana. Los constructos transgénicos con una región 3'E incompleta, que generalmente solo proporciona el elemento hs1,2, condujeron a niveles de expresión decepcionantes en ratones transgénicos, incluso cuando el locus endógeno de IgH estaba desactivado. Como consecuencia, solo se han aislado algunas IgG completamente humanas específicas de antígeno de constructos producidas en los últimos 20 años (Lonberg et al., Nature 368, 856 [1994]; Nicholson et al., J. Immunol., 163, 6898 [1999]; Davis et al., Cancer Metastasis Rev. 18, 421 [1999]; Pruzina et al., Protein Engineering, Design and Selection, 1, [2011]). En el locus de IgH de rata, la región 3'E solo ha sido pobremente analizada. Una comparación de las secuencias de ratones y ratas no permitió la identificación de hs4, el cuarto elemento crucial con secuencias reguladoras importantes adicionales más adelante (Chatterjee et al., J. Biol. Chem., 286, 29303 [2011]). Los polinucleótidos de la presente invención proporcionan ventajosamente una expresión óptima debido, al menos en parte, a la inclusión de un potenciador 3' de rata, ya que los polinucleótidos quiméricos que carecen de este potenciador 3' dan como resultado un cambio de isotipo deteriorado y una baja expresión de IgG. El potenciador 3' de rata tiene una secuencia que comprende o es sustancialmente homóloga a la secuencia establecida como la SEQ ID NO: 1.

Como se usa en el presente documento, un polinucleótido que tiene una secuencia que comprende o es sustancialmente homóloga a una porción, por ejemplo, menor que la totalidad, de la segunda secuencia (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, etc.) preferiblemente retiene la actividad biológica de la segunda secuencia (por ejemplo, retiene la actividad biológica de un potenciador 3' para proporcionar una expresión óptima y/o cambio de isotipo de inmunoglobulinas, es capaz de reorganizarse para proporcionar una cadena pesada quimérica humanizada, etc.). En una realización, un ácido nucleico que comprende una secuencia que comprende o es sustancialmente homóloga a una porción dela SEQ ID NO: 1 comprende al menos 8 kB, preferiblemente al menos 10 kB de ácidos nucleicos continuos que son sustancialmente homólogos a la SEQ ID NO: 1.

El "locus de Ig artificial" como se usa en el presente documento puede referirse a polinucleótidos que (por ejemplo, una secuencia que comprende las regiones V, D y/o J en el caso de la cadena pesada, o regiones V y/o J en el caso de cadena ligera, y opcionalmente una región constante para una o ambas cadenas pesadas y ligeras) que no están reorganizadas, parcialmente reorganizadas o reorganizadas. Los loci de Ig artificial incluyen loci de cadena ligera de Ig artificial y loci de cadena pesada de Ig artificial. En una realización, un locus de inmunoglobulina artificial de la invención es funcional y capaz de reorganizarse y producir un repertorio de cadenas de inmunoglobulina. En una realización preferida, el dominio variable o parte del mismo de un polinucleótido divulgado en el presente documento comprende genes en configuración natural, es decir, secuencias que se producen naturalmente de un segmento del gen de Ig humano, formas degeneradas de secuencias que se producen naturalmente de un segmento del gen de Ig humano, así como secuencias sintéticas que codifican una secuencia polipeptídica sustancialmente idéntica al polipéptido codificado por una secuencia natural de un segmento del gen de Ig humana. En otra realización preferida, el polinucleótido comprende un dominio variable o una porción del mismo en una configuración natural que se encuentra en humanos. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica una cadena pesada de Ig artificial como se divulga en el presente documento puede comprender en configuración natural al menos dos genes de V humanos, al menos dos genes D, al menos dos genes J o una combinación de los mismos.

En una realización preferida, un locus de Ig artificial comprende un gen de la región C no humana y es capaz de producir un repertorio de inmunoglobulinas que incluyen inmunoglobulinas quiméricas que tienen una región C no humana. En una realización, un locus de Ig artificial comprende un gen de la región C humana y es capaz de producir un repertorio de inmunoglobulinas que incluyen inmunoglobulinas que tienen una región C humana. En una realización, un locus de Ig artificial comprende un "gen de región constante artificial", por lo que se entiende un gen de región constante que comprende secuencias de nucleótidos derivadas de genes de regiones constantes humanas y no humanas. Por ejemplo, un ejemplo de un gen de región constante artificial C es un gen de región constante que codifica un dominio CH1 de IgG humana y un dominio CH2 y CH3 de IgG de rata.

En una realización preferida, un locus de Ig artificial comprende secuencias potenciadoras 3', que incluyen hs1,2, hs3a, hs3b y secuencias (500-2500 nt) secuencia abajo de hs3b. En animales transgénicos, los loci artificiales que comprenden la región 3'E completa de ~30 kb desde Calfa hasta 3'hs3b dan como resultado una expresión de IgG

de alto nivel, hipermutación extensa y grandes cantidades de hibridomas específicos de antígeno de alta afinidad (pM). Sin embargo, las secuencias potenciadoras más cortas reducen la expresión de Ig.

En una realización preferida, un locus de Ig artificial comprende la secuencia potenciadora 3' mostrada en la Figura 1a. Esta secuencia se deriva del locus de la cadena pesada de Ig de rata y contiene aproximadamente 30 kb de la región 3' desde Calfa hasta 3'hs3b. La secuencia de la secuencia potenciadora 3' de rata se establece como la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el locus de Ig artificial comprende una secuencia que comprende o es sustancialmente homóloga a la secuencia establecida como la SEQ ID NO: 1, o una porción de la misma.

En algunas realizaciones, un locus de cadena pesada de Ig artificial carece de CH1, o una secuencia equivalente que permite que la inmunoglobulina resultante evite la asociación típica de inmunoglobulina: chaperona. Tales loci artificiales proporcionan la producción de anticuerpos solo de cadena pesada en animales transgénicos que carecen de un locus de cadena ligera de Ig funcional y, por lo tanto, no expresan la cadena ligera de Ig funcional. Tales loci de cadena pesada de Ig artificial se usan en métodos contemplados en el presente documento para producir animales transgénicos que carecen de un locus de cadena ligera de Ig funcional, y que comprenden un locus de cadena pesada de Ig artificial, que los animales son capaces de producir anticuerpos solo de cadena pesada. Alternativamente, un locus de Ig artificial puede manipularse *in situ* para alterar CH1 o una región equivalente y generar un locus de cadena pesada de Ig artificial que proporciona la producción de anticuerpos solo de cadena pesada. Con respecto a la producción de anticuerpos solo de cadena pesada en ratones deficientes en cadena ligera, véase, por ejemplo, Zou et al., JEM, 204: 3271-3283, 2007.

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

Por "anticuerpo quimérico" o "inmunoglobulina quimérica" se entiende una molécula de inmunoglobulina que comprende una porción de una secuencia de polipéptidos de inmunoglobulina humana (o una secuencia de polipéptidos codificada por un segmento del gen de Ig humana) y una porción de una secuencia del polipéptido de inmunoglobulina no humana. Las moléculas de inmunoglobulina quimérica de la presente invención son inmunoglobulinas con regiones Fc no humanas o regiones Fc artificiales, e idiotipos humanos. Dichas inmunoglobulinas pueden aislarse de animales de la invención que han sido modificadas para producir moléculas de inmunoglobulinas quiméricas.

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

El término "segmento del gen de Ig", como se usa en el presente documento, se refiere a regiones de ADN que codifican diversas porciones de una molécula de Ig, que están presentes en la línea germinal de animales no humanos y humanos, y que se unen en células B para formar los genes Ig reorganizados. Por lo tanto, los segmentos del gen de Ig como se usan en el presente documento incluyen segmentos del gen V, segmentos del gen D, segmentos del gen J y segmentos del gen C.

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

Los polinucleótidos relacionados con la presente invención pueden comprender ADN o ARN y pueden ser total o parcialmente sintéticos. La referencia a una secuencia de nucleótidos como se establece en el presente documento abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada, y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que U está sustituido por T, a menos que el contexto requiera lo contrario.

Los cálculos de "homología" o "identidad de secuencia" entre dos secuencias (los términos se usan indistintamente en el presente documento) se realizan de la siguiente manera. Las secuencias se alinean para fines de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir huecos en uno o ambos de una primera y segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para una alineación óptima y se pueden descartar secuencias no homólogas para fines de comparación). En una realización preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada para fines de comparación es al menos 30%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 60% e incluso más preferiblemente al menos 70%, 80%, 90%, 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Luego se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está

ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en el presente documento, la "identidad" de aminoácidos o ácidos nucleicos es equivalente a "homología" de aminoácidos o ácidos nucleicos). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48: 444-53), que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en línea en gcg.com), utilizando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En otra realización preferida más, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Un conjunto de parámetros particularmente preferido (y el que debe usarse si el profesional no está seguro sobre qué parámetros deben aplicarse para determinar si una molécula está dentro de una identidad de secuencia o limitación de homología de la invención) es una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización por extensión de hueco de 4 y una penalización de hueco por cambio de marco de 5. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos también puede determinarse usando el algoritmo de Meyers y Miller ((1989) CABIOS 4: 11-17), que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4.

Loci de Ig artificial

La presente invención se dirige además a loci de Ig artificiales y su uso en la fabricación de animales transgénicos capaces de producir inmunoglobulinas que tienen un idiotipo humano. Cada locus de Ig artificial comprende múltiples segmentos del gen de inmunoglobulina, que incluyen al menos un segmento del gen de la región V, uno o más segmentos del gen J, uno o más segmentos del gen D en el caso de un locus de la cadena pesada y uno o más genes de la región constante. En la presente invención, al menos uno de los segmentos del gen V codifica una línea germinal o una secuencia de aminoácidos de la región V humana hipermutada. Por consiguiente, tales animales transgénicos tienen la capacidad de producir un repertorio diversificado de moléculas de inmunoglobulina, que incluye anticuerpos que tienen un idiotipo humano. En loci de cadena pesada, pueden incluirse segmentos del gen D derivados de humanos o no humanos en los loci de Ig artificial. Los segmentos de genes en tales loci se yuxtaponen entre sí en una configuración no reorganizada (o "la configuración de la línea germinal"), o en una configuración parcial o totalmente reorganizada. Los loci de Ig artificial tienen la capacidad de experimentar un reordenamiento de genes (si los segmentos del gen no están completamente reorganizados) en el animal en cuestión, produciendo por lo tanto un repertorio diversificado de inmunoglobulinas que tienen idiotipos humanos.

Los elementos reguladores como promotores, potenciadores, regiones de conmutación, señales de recombinación y similares pueden ser de origen humano o no humano. Lo que se requiere es que los elementos sean operables en las especies animales en cuestión, para volver funcionales los loci artificiales. Los elementos reguladores preferidos se describen con más detalle en el presente documento.

En una realización, la invención proporciona un polinucleótido quimérico como se describe en el presente documento que contiene un locus de cadena pesada artificial capaz de sufrir una reorganización de genes en el animal huésped produciendo así un repertorio diversificado de cadenas pesadas que tienen idiotipos humanos. Un locus de cadena pesada artificial del transgén contiene una región V con al menos un segmento del gen V humano. Preferiblemente, la región V incluye al menos aproximadamente 5-100 segmentos del gen V de cadena pesada humana (o "VH"). Como se describió anteriormente, un segmento VH humano abarca secuencias naturales de un segmento del gen VH humano, formas degeneradas de secuencias naturales de un segmento del gen VH humano, así como secuencias sintéticas que codifican una secuencia de polipéptidos sustancialmente (es decir, al menos aproximadamente 85%-95%) idéntica a un polipéptido del dominio V de cadena pesada humana.

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

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

En una realización preferida, un locus de Ig artificial comprende secuencias potenciadoras 3', que incluyen hs1,2, hs3a, hs3b y secuencias entre Calfa y 3'hs3b de rata.

En otra realización preferida, el locus de cadena pesada artificial contiene genes artificiales de región constante que carecen de dominios CH1. En una realización preferida, tales genes artificiales de región constante codifican IgM y/o IgG truncadas que carecen del dominio CH1 pero que comprenden dominios CH2 y CH3, o CH1, CH2, CH3 y CH4. Las cadenas pesadas que carecen de dominios CH1 no pueden emparejarse eficazmente con las cadenas ligeras de Ig y formar anticuerpos sólo de cadena pesada.

En una realización, la invención proporciona un polinucleótido quimérico que contiene un locus de cadena ligera artificial capaz de sufrir un reordenamiento génico en el animal huésped produciendo así un repertorio diversificado de cadenas ligeras que tienen idiotipos humanos. Un locus de cadena ligera artificial del transgén contiene una región V con al menos un segmento del gen V humano, por ejemplo, una región V que tiene al menos un gen VL humano y/o al menos un segmento VJ humano reordenado. Preferiblemente, la región V incluye al menos aproximadamente 5-100 segmentos del gen V de la cadena ligera humana (o "VL"). Consistentemente, un segmento VL humano abarca secuencias naturales de un segmento del gen VL humano, formas degeneradas de secuencias naturales de un segmento del gen VL humano, así como secuencias sintéticas que codifican una secuencia de polipéptido sustancialmente (es decir, al menos aproximadamente 85% - 95%) idéntica a un polipéptido del dominio V de cadena ligera humana. En una realización, el locus de Ig de cadena ligera artificial tiene una región C que tiene al menos un gen C de rata (por ejemplo, Cλ o Cκ de rata).

En este documento se describen métodos para elaborar un vector transgénico que contiene un locus de Ig artificial. Dichos métodos implican aislar loci de Ig o fragmentos de los mismos, y combinarlos, con uno o varios fragmentos de ADN que comprenden secuencias que codifican elementos de la región V humana. El segmento o segmentos del gen de Ig se insertan en el locus de Ig artificial o una porción del mismo mediante ligadura o recombinación homóloga de tal manera que retengan la capacidad del locus para experimentar una reorganización de genes efectiva en el animal en cuestión.

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

Los segmentos de genes de Ig humana pueden integrarse en el locus de Ig en un vector (por ejemplo, un clon de BAC) mediante una variedad de métodos, que incluyen la ligadura de fragmentos de ADN o la inserción de fragmentos de ADN por recombinación homóloga. La integración de los segmentos del gen de Ig humana se realiza de tal manera que el segmento del gen de Ig humana está operativamente unido a la secuencia del animal huésped en el transgén para producir un locus de Ig humanizado funcional, es decir, un locus de Ig capaz de reorganizar genes que conducen a la producción de un repertorio diversificado de anticuerpos con idiotipos humanos. La recombinación homóloga se puede realizar en bacterias, levaduras y otras células con una alta frecuencia de eventos de recombinación homóloga. Los YAC y BAC modificados pueden aislarse fácilmente de las células y usarse para elaborar animales transgénicos.

Ovocitos de roedores y animales transgénicos que comprenden loci de Ig artificiales y capaces de producir anticuerpos que tienen idiotipos humanos

En este documento se describen animales transgénicos capaces de producir inmunoglobulinas que tienen idiotipos humanos, así como métodos para fabricarlos.

Los animales transgénicos utilizados se seleccionan de roedores (por ejemplo, ratas, hámsteres, ratones y cobayas).

Los animales transgénicos usados para la producción de anticuerpos humanizados en la invención portan mutaciones de línea germinal en loci de Ig endógenos. En una realización preferida, los animales transgénicos son homocigotos para genes de cadena pesada de Ig y/o cadena ligera de Ig endógenos mutados. Además, estos animales portan al menos un locus de Ig artificial que es funcional y capaz de producir un repertorio de moléculas de inmunoglobulina en el animal transgénico. Los loci de Ig artificiales utilizados en la invención incluyen al menos un segmento del gen V humano.

Los animales transgénicos pueden transportar al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial y al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial que son funcionales y capaces de producir un repertorio de moléculas de inmunoglobulina en el animal transgénico, cuyo repertorio de moléculas de inmunoglobulina incluye anticuerpos que tienen un idiotipo humano. Se pueden usar loci artificiales que incluyen al menos un gen C no humano, y se proporcionan animales capaces de producir anticuerpos quiméricos que tienen un idiotipo humano y una región constante no humana. Se pueden usar loci artificiales que incluyen al menos un gen C humano, y se proporcionan animales capaces de producir anticuerpos que tienen un idiotipo humano y una región constante humana.

Los animales transgénicos pueden transportar al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial, y carecen de un locus de cadena ligera de Ig funcional. Tales animales encuentran uso en la producción de anticuerpos sólo de cadena pesada.

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

Los loci artificiales utilizados para generar tales animales transgénicos incluyen cada uno múltiples segmentos del gen de inmunoglobulina, que incluyen al menos un segmento del gen de la región V, uno o más segmentos del gen J, uno o más segmentos del gen D en el caso de un locus de cadena pesada, y uno o más genes de región constante. En la presente invención, al menos uno de los segmentos del gen V codifica una línea germinal o una secuencia de aminoácidos de la región V humana hipermutada. Por consiguiente, tales animales transgénicos tienen la capacidad de producir un repertorio diversificado de moléculas de inmunoglobulina, que incluyen anticuerpos que tienen un idiotipo humano.

Los loci artificiales utilizados pueden comprender al menos un segmento génico de la región C no humana. Por consiguiente, tales animales transgénicos tienen la capacidad de producir un repertorio diversificado de moléculas de inmunoglobulina, que incluyen anticuerpos quiméricos que tienen un idiotipo humano.

Los loci artificiales utilizados pueden comprender al menos un segmento génico de la región C humana. En consecuencia, dichos animales transgénicos tienen la capacidad de producir un repertorio diversificado de moléculas de inmunoglobulina, que incluyen anticuerpos que tienen un idiotipo humano y una región constante humana.

Los loci artificiales utilizados pueden comprender al menos un gen de región constante artificial. Por ejemplo, un ejemplo de gen de región constante C artificial es un gen de región constante que codifica un dominio CH1 de IgG humana y un dominio CH2 y CH3 de IgG de rata. Por consiguiente, tales animales transgénicos tienen la capacidad de producir un repertorio diversificado de moléculas de inmunoglobulina, que incluyen anticuerpos que tienen un idiotipo humano y una región constante artificial que comprende componentes humanos y no humanos.

El vector transgénico que contiene un locus de Ig artificial se introduce en la célula o células receptoras y luego se integra en el genoma de la célula o células receptoras mediante integración aleatoria o mediante integración dirigida.

Para la integración aleatoria, un vector transgénico que contiene un locus de Ig artificial puede introducirse en una célula receptora mediante tecnología transgénica estándar. Por ejemplo, un vector transgénico puede inyectarse directamente en el pronúcleo de un ovocito fertilizado. También se puede introducir un vector transgénico mediante la incubación conjunta de esperma con el vector transgénico antes de la fertilización del ovocito. Los animales transgénicos pueden desarrollarse a partir de ovocitos fertilizados. Otra forma de introducir un vector transgénico es mediante transfección de células madre embrionarias u otras células pluripotentes (por ejemplo, células germinales primordiales) y luego inyectando las células genéticamente modificadas en embriones en desarrollo. Alternativamente, un vector transgénico (desnudo o en combinación con reactivos facilitadores) puede inyectarse directamente en un embrión en desarrollo. Finalmente, los animales transgénicos quiméricos se producen a partir de los embriones que contienen el transgén Ig artificial integrado en el genoma de al menos algunas células somáticas del animal transgénico. El vector transgénico puede introducirse en el genoma de una célula y un animal se deriva de la célula transfectada mediante clonación por transferencia nuclear.

Un transgén que contiene un locus de Ig artificial puede integrarse aleatoriamente en el genoma de las células receptoras (tales como los ovocitos fertilizados o los embriones en desarrollo). Se pueden obtener descendientes que son nulizigotos para la cadena pesada de Ig y/o la cadena ligera de Ig endógena y, en consecuencia, incapaces de producir inmunoglobulinas endógenas y capaces de producir inmunoglobulinas transgénicas.

Para la integración dirigida, se puede introducir un vector transgénico en células receptoras apropiadas tales como células madre embrionarias, otras células pluripotentes o células somáticas ya diferenciadas. Posteriormente, las células en las que el transgén se ha integrado en el genoma animal se pueden seleccionar por métodos estándar. Las células seleccionadas pueden fusionarse luego con células de unidad de transferencia nuclear enucleadas, por ejemplo, ovocitos o células madre embrionarias, células que son totipotentes y capaces de formar un neonato funcional. La fusión se realiza de acuerdo con técnicas convencionales que están bien establecidas. Véase, por ejemplo, Cibelli et al., Science (1998) 280: 1256; Zhou et al., Science (2003) 301: 1179. La enucleación de los

ovocitos y la transferencia nuclear también se pueden realizar mediante microcirugía usando pipetas de inyección (véase, por ejemplo, Wakayama et al., Nature (1998) 394: 369). Las células resultantes se cultivan en un medio apropiado y se transfieren a receptores sincronizados para generar animales transgénicos. Alternativamente, las células genéticamente modificadas seleccionadas pueden inyectarse en embriones en desarrollo que posteriormente se desarrollan en animales quiméricos.

Se puede usar una meganucleasa para aumentar la frecuencia de recombinación homóloga en un sitio objetivo a través de la escisión de ADN de doble cadena. Para la integración en un sitio específico, se puede usar una meganucleasa específica del sitio. Se puede usar una meganucleasa dirigida a un locus de Ig endógeno para aumentar la frecuencia de recombinación homóloga y reemplazo de un locus de Ig endógeno, o partes del mismo con un locus de Ig artificial, o partes del mismo. En una realización, el animal transgénico carece de un locus de cadena ligera de Ig funcional y comprende un locus de cadena pesada de Ig artificial.

Inmunoglobulinas que tienen un idiotipo humano.

Una vez que se elabora un animal transgénico capaz de producir inmunoglobulinas que tienen un idiotipo humano, se pueden obtener fácilmente inmunoglobulinas y preparaciones de anticuerpos contra un antígeno inmunizando al animal con el antígeno. La "composición de antisueros policlonales" como se usa en el presente documento incluye preparaciones de anticuerpos policlonales purificados por afinidad.

Se puede usar una variedad de antígenos para inmunizar un animal transgénico. Dichos antígenos incluyen, entre otros, microorganismos, por ejemplo, virus y organismos unicelulares (tales como bacterias y hongos), vivos, atenuados o muertos, fragmentos de microorganismos o moléculas antigénicas aisladas de los microorganismos.

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

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

Los antígenos preferidos para su uso en la inmunización para generar anticuerpos contra virus incluyen las proteínas de envoltura y las versiones atenuadas de virus que incluyen, entre otros, el virus sincitial respiratorio (RSV) (particularmente la proteína F), el virus de la hepatitis C (HCV), virus de Hepatitis B (HBV), citomegalovirus (CMV), EBV y HSV.

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

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

Para fabricar un anticuerpo monoclonal, las células del bazo se aíslan del animal transgénico inmunizado y se usan en fusión celular con líneas celulares transformadas para la producción de hibridomas, o los ADNc que codifican anticuerpos se clonan mediante técnicas estándar de biología molecular y se expresan en células transfectadas. Los procedimientos para fabricar anticuerpos monoclonales están bien establecidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea 0 583 980 A1 ("Método para generar anticuerpos monoclonales a partir de conejos"), la patente de los Estados Unidos No. 4,977,081 ("Hibridomas estables de conejo-ratón y productos de secreción de los mismos"), documento WO 97/16537 ("Línea estable de células B de pollo y método de uso de la misma), y el documento EP 0 491 057 B1 ("Hibridoma que produce inmunoglobulina G aviar específica"), cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento como referencia. La producción *in vitro* de anticuerpos monoclonales a partir de moléculas de ADNc clonadas ha sido descrita por Andris-Widhopf et al., "Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display", J Immunol Methods 242: 159 (2000), y por Burton, DR, "Phage display", Immunotechnology 1: 87 (1995).

Una vez que se han generado anticuerpos monoclonales quiméricos con idiotipos humanos, dichos anticuerpos quiméricos se pueden convertir fácilmente en anticuerpos completamente humanos usando técnicas estándar de biología molecular. Los anticuerpos monoclonales completamente humanos no son inmunogénicos en humanos y son apropiados para su uso en el tratamiento terapéutico de sujetos humanos.

Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos sólo de cadena pesada

Los animales transgénicos que carecen de un locus funcional de cadena ligera de Ig, y que comprenden un locus artificial de cadena pesada, pueden inmunizarse con antígeno para producir anticuerpos sólo de cadena pesada que se unen específicamente al antígeno.

También se describen células productoras de anticuerpos monoclonales derivadas de tales animales, así como ácidos nucleicos derivados de los mismos. También se proporcionan hibridomas derivados de los mismos. También se describen anticuerpos totalmente humanos sólo de cadena pesada, así como ácidos nucleicos codificadores, derivados de los mismos.

Las enseñanzas sobre los anticuerpos solo de cadena pesada se encuentran en la técnica. Por ejemplo, véanse las publicaciones PCT WO02085944, WO02085945, WO2006008548 y WO2007096779. Véanse también los documentos US 5,840,526; US 5,874,541; US 6,005,079; US 6,765,087; US 5,800,988; EP 1589107; WO 9734103; y US 6,015,695.

Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos monoclonales o policlonales purificados pueden mezclarse con un vehículo farmacéutico apropiado adecuado para la administración a pacientes, para proporcionar composiciones farmacéuticas.

Los pacientes tratados con las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento son preferiblemente mamíferos, más preferiblemente humanos, aunque también se contemplan usos veterinarios.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden emplearse en las presentes composiciones farmacéuticas pueden ser todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, agentes isotónicos y similares. Excepto en la medida en que cualquier medio, agente, diluyente o vehículo convencional sea perjudicial para el receptor o para la efectividad terapéutica de los anticuerpos contenidos en él, su uso en las composiciones farmacéuticas descritas en este documento es apropiado.

El vehículo puede ser líquido, semisólido, por ejemplo, pastas o portadores sólidos. Los ejemplos de vehículos incluyen aceites, agua, soluciones salinas, alcohol, azúcar, gel, lípidos, liposomas, resinas, matrices porosas, aglutinantes, rellenos, recubrimientos, conservantes y similares, o combinaciones de los mismos.

Métodos de tratamiento

Se describen métodos para tratar una enfermedad en un vertebrado, preferiblemente un mamífero, preferiblemente un primate, siendo los sujetos humanos una realización especialmente preferida, administrando una composición de anticuerpo purificada como se describe en el presente documento deseable para tratar dicha enfermedad.

Las composiciones de anticuerpos se pueden usar para unir y neutralizar o modular una entidad antigénica en los tejidos del cuerpo humano que causa o contribuye a la enfermedad o que provoca respuestas inmunes no deseadas o anormales. Una "entidad antigénica" se define en el presente documento para abarcar cualquier molécula soluble o unida a la superficie celular que incluye proteínas, así como células u organismos o agentes infecciosos que causan enfermedades que son al menos capaces de unirse a un anticuerpo y preferiblemente también son capaces de estimular una respuesta inmune.

La administración de una composición de anticuerpos contra un agente infeccioso como monoterapia o en combinación con quimioterapia da como resultado la eliminación de partículas infecciosas. Una sola administración de anticuerpos disminuye el número de partículas infecciosas generalmente de 10 a 100 veces, más comúnmente más de 1000 veces. De manera similar, la terapia con anticuerpos en pacientes con una enfermedad maligna empleada como monoterapia o en combinación con quimioterapia reduce el número de células malignas, generalmente de 10 a 100 veces, o más de 1000 veces. La terapia puede repetirse durante un período de tiempo prolongado para asegurar la eliminación completa de partículas infecciosas, células malignas, etc. En algunos casos, la terapia con preparaciones de anticuerpos continuará durante períodos prolongados en ausencia de cantidades detectables de partículas infecciosas o células indeseables.

De manera similar, el uso de terapia con anticuerpos para la modulación de respuestas inmunes puede consistir en administraciones únicas o múltiples de anticuerpos terapéuticos. La terapia puede continuarse por períodos prolongados en ausencia de síntomas de enfermedad.

El tratamiento del sujeto puede emplearse junto con quimioterapia con dosis suficientes para inhibir enfermedades infecciosas o tumores malignos. En pacientes con enfermedades autoinmunes o receptores de trasplantes, la terapia con anticuerpos se puede emplear junto con la terapia inmunosupresora en dosis suficientes para inhibir las reacciones inmunes.

Ejemplos

En ratones transgénicos para loci de inmunoglobulina (Ig) humana, la eficacia subóptima en el suministro de anticuerpos completamente humanos se ha atribuido a la interacción imperfecta entre las regiones constantes de cadenas de IgH de membrana humana y la maquinaria de señalización celular de ratón. Para evitar este problema, se describe en el presente documento una cepa de rata humanizada (OmniRat^{MR}) que transporta un locus quimérico de IgH humano/rata [que comprende 22 V_H humanos, todos los segmentos D y J_H humanos en configuración natural pero unidos al locus de C_H de rata] junto con loci de cadena ligera completamente humanos [12 V_{KS} unidos a Jκ-Cκ y 16 Vλ unidos a Jλ-Cλ]. Los loci de Ig de rata endógenos fueron silenciados por nucleasas de dedo de zinc de diseñador. Después de la inmunización, las OmniRat se desempeñan tan eficientemente como las ratas normales para producir IgG en suero de alta afinidad. Los anticuerpos monoclonales, que comprenden regiones variables completamente humanas con afinidad antigénica sub-nanomolar y que transportan mutaciones somáticas extensas, son fácilmente obtenibles, de manera similar al rendimiento de anticuerpos convencionales de ratas normales.

Materiales y métodos

Construcción de loci de Ig humanos modificados en YAC y BAC

a) loci de IgH

Los genes de V de IgH humana estaban cubiertos por 2 BAC: BAC6-VH3-11 que contenía la región auténtica que abarcaba desde VH4-39 hasta VH3-23 seguido de VH3-11 (modificado a partir de un clon de BAC comercialmente disponible 3054M17 CITB) y BAC3 que contiene la región auténtica que abarca desde VH3-11 hasta VH6-1 (811L16 RPCI-11). Se construyó un BAC denominado Annabel uniendo genes de la región CH de la rata inmediatamente secuencia abajo de la región VH6-1-Ds-JHs humana (Figura 1). Todos los clones de BAC que contenían parte del locus de IgH humano o de rata se adquirieron a través de Invitrogen.

Tanto BAC6-VH3-11 como Annabel se construyeron inicialmente en *S. cerevisiae* como YAC circulares (cYAC) y luego se verificaron y mantuvieron en *E. coli* como BAC. Los detalles de la construcción se pueden encontrar en www.ratltd.net.

A diferencia de los YAC, las preparaciones de plásmidos BAC producen grandes cantidades del ADN deseado. Para convertir un YAC lineal en un cYAC o ensamblar fragmentos de ADN con extremos superpuestos en un solo cYAC en *S. cerevisiae,* que también se puede mantener como un BAC en *E. coli*, se construyeron dos vectores lanzadera de *S. cerevisiae* /*E coli* autorreplicantes, pBelo-CEN-URA y pBelo-CEN-HYG. En resumen, se cortó CEN4 de *S. cerevisiae* como un fragmento AvrII de pYAC-RC[39] y se ligó a pAP599[40] linealizado con SpeI. El plásmido resultante contiene CEN4 clonado entre URA3 de *S. cerevisiae* y un casete de expresión de resistencia a la higromicina (HygR). A partir de este plásmido, se cortó un fragmento ApaLIBamHI que contenía URA3 seguido por CEN4 o un fragmento de PmLI-SphI que contenía CEN4 seguido por HygR, y se ligó a ApaLI y BamHI o pBACBelo11 doblemente digerido con HpaI y SphI (New England Biolabs) para producir pBelo-CEN -URA y pBelo-CEN-HYG.

Para construir BAC6-VH3-11, inicialmente se cortaron dos fragmentos, un NotI-PmeI de 115 kb y un RsrII-SgrAI de 110 kb, a partir del clon de BAC 3054M17 CITB. El extremo 3' del primer fragmento se superpone a 22 kb con el extremo 5' del último. El fragmento NotI-PmeI se ligó a un brazo de YAC NotI-BamHI que contenía CEN4 de *S. cerevisiae* así como TRP1/ARS1 de pYAC-RC, y el fragmento RsrII-SgrAI se ligó a un brazo YAC SgrAI-BamHI que contenía URA3 de *S. cerevisiae*, también de pYAC-RC. Posteriormente, la mezcla de ligación se transformó en células AB1380 de *S. cerevisiae* mediante la transformación de esferoplasto[41], y se seleccionaron clones de levadura URA+ TRP+. Los clones, denominados YAC6, que contienen la región lineal de VH4-39 a VH3-23 humana se confirmaron mediante análisis de transferencia Southern. YAC6 se extendió adicionalmente mediante la adición de un fragmento 3' de 10.6 kb de VH3-23, y conversión a un cYAC. La extensión de 10.6 kb contiene VH3-11 humano y también ocurre en el extremo 5' de BAC3. Se construyó pBeloHYG-YAC6+ BAC3 (5') para la modificación de YAC6. En resumen, se prepararon 3 fragmentos con extremos superpuestos por PCR: 1) un fragmento de 'material' que contiene TRP1-ARS1 de *S. cerevisiae* flanqueado por sitios HpaI con cola 5' que coincide con la secuencia, secuencia arriba de VH4-39 y cola 3' que coincide secuencia abajo de VH3 -23 en YAC6 (usando oligos largos 561 y 562, y pYAC-RC como plantilla), 2) el fragmento de extensión de 10.6 kb con una cola 5' que coincide con la secuencia, secuencia abajo de VH3-23 como se describió anteriormente y un sitio AscI único en su extremo 3' (usando oligos largos 570 y 412, y ADN genómico humano como plantilla), y 3) el vector pBelo-CEN-HYG con el CEN4 unido secuencia abajo con una cola de homología que coincide con el extremo 3' del fragmento de extensión de 10.6 kb y el HygR unido secuencia arriba con una cola que coincide con la secuencia, secuencia arriba de VH4-39 como se describió anteriormente (usando oligos largos 414 y 566, y pBelo-CEN-HYG como plantilla).

Posteriormente, los 3 fragmentos de PCR se ensamblaron en un pequeño cYAC que confiere HYGR y TRP+ en *S. cerevisiae* mediante recombinación homóloga asociada con la transformación de esferoplastos, y este cYAC se convirtió además en el BAC pBeloHYG-YAC6+BAC3(5'). Finalmente, el pBeloHYG-YAC6+BAC3(5') digerido con HpaI se usó para transformar células de levadura que portaban YAC6, y mediante recombinación homóloga se generó cYAC BAC6-VH3-11 que confiere solo HYGR. A través de la transformación, véase más abajo, este cYAC se introdujo como un BAC en *E. coli*. Los genes de VH humano en BAC6-VH3-11 se cortaron como un fragmento de AsiSI-(que ocurre naturalmente en el HygR)-AscI, de ~182 kb y los genes de VH en BAC3 se cortaron como un fragmento de NotI de ~173 kb (Figura 1 parte superior).

Para el ensamblaje de la región C con la superposición de VH, la región VH6-1-Ds-JHs humana tuvo que unirse con la secuencia genómica de rata inmediatamente secuencia debajo de la último JH seguida por las C de rata para producir una cYAC/BAC. Para lograr esto, se prepararon 5 restricciones superpuestas, así como fragmentos de PCR; un fragmento 5' de 6.1 kb de VH6-1 humano (usando oligos 383 y 384, y ADN genómico humano como plantilla), un fragmento PvuI-PacI de ~78 kb que contenía la región VH6-1-Ds-JHs humana cortada de BAC1 (RP11645E6), un fragmento de 8.7 kb que une el JH6 humano con la secuencia genómica de rata inmediatamente secuencia abajo del último JH y que contiene parte de la secuencia de codificación μ de rata (usando oligos 488 y 346, y ADN genómico de rata como plantilla), un fragmento NotI de ~ 52 kb de PmeI que contiene la región auténtica μ, δ y γ2c de rata cortada de BAC M5 (CH230-408M5) y el vector pBelo-CEN-URA con el URA3 unido secuencia abajo con una cola de homología que coincide con el extremo 3' de la región γ2c de rata y el CEN4 se unió secuencia arriba con una cola que coincidía con la región 5' del VH6-1 humano como se describió (usando oligos largos 385 y 550, y pBelo-CEN-URA como plantilla). El ensamblaje correcto mediante recombinación homóloga en *S. cerevisiae* se analizó por PCR y el cYAC purificado de los clones correctos se convirtió en un BAC en *E. coli*.

Para el ensamblaje de Annabel, se usaron partes del cYAC/BAC anterior que contenía VH6-1-Ds-JH humano seguido de la región auténtica μ, δ y γ2c de rata, así como fragmentos de PCR. Cinco fragmentos superpuestos contenían el fragmento de 6.1 kb en el extremo 5' del VH6-1 humano como se describió anteriormente, un fragmento SpeI de ~83 kb que comprende VH6-1-Ds-JHs humano seguido inmediatamente por la secuencia genómica de rata secuencia abajo del último JH y que contiene parte de Cμ de rata, un fragmento de 5.2 kb que une el extremo 3' de μ de rata con el extremo 5' γ1 de rata (usando oligos 490 y 534, y ADN genómico de rata como plantilla), un fragmento de NotI-SgrAI de ~118 kb que contiene la región auténtica potenciadora de IgH γ1, γ2b, ε, α y 3'E de rata cortada de BAC 18 (CH230-162I08), y el vector pBelo-CEN-URA con el URA3 unido secuencia abajo con una cola de homología que coincide con el extremo 3' del 3'E de rata y el CEN4 unidos secuencia arriba con una cola que coincide con el extremo 5' del VH6-1 humano como se describió anteriormente. Existe una superposición de 10.3 kb entre las regiones VH6-1 humanas tanto en BAC3 como en Annabel. Las VH6-1-Ds-JHs seguidos por la región CH de rata junto con el URA3 de *S. cerevisiae* en Annabel pueden cortarse como un solo fragmento de NotI de ~183 kb (véase la Figura 1 en la parte superior).

BAC6-VH3-11, BAC3 y Annabel se comprobaron exhaustivamente mediante análisis de restricción y secuenciación parcial para verificar su autenticidad.

b) loci de IgL

El locus de Igλ humano en un YAC de ~410 kb se obtuvo mediante ensamblaje de recombinación de un YAC de Vλ con 3 Cλ que contienen cósmidos[25]. El reordenamiento y la expresión se verificaron en ratones transgénicos derivados de células ES que contenían una copia de un YAC de Igλ humano completo[38]. Este YAC de Igλ se acortó mediante la generación de un YAC circular que eliminaba ~100 kb de la región 5' de Vλ3-27. El vector pYAC-RC se digirió con ClaI y BspEI para eliminar URA3 y se ligó con un fragmento ClaI/NgoMIV de pAP 599 que contenía HYG. La PCR de la región que contenía el centrómero de levadura y el gen marcador de higromicina del nuevo vector (pYAC-RC-HYG) se realizó con cebadores con extremos 5' homólogos a una región 5' de Vλ3-27 (cebador 276) y dentro del gen marcador ADE2 en el brazo de YAC (cebador 275). El fragmento de PCR (3.8 kb) se integró en el YAC de Igλ usando un método de transformación de acetato de litio de alta eficiencia[42] y selección en placas de YPD que contenían higromicina. El ADN se preparó a partir de los clones (kit de purificación de ADN de levadura Epicenter MasterPure) y se analizó la unión correcta por PCR usando los siguientes oligos: 243 + 278 y extremo R de Hyg + 238. Se elaboraron tapones[43] y los cromosomas de levadura se eliminaron por PFGE (Gel de agarosa al 0.8% (PFC) (Biorad) [6 V/cm, tiempos de pulso de 60 s durante 10 h y 10 s durante 10 h, 8 °C) dejando el cromosoma artificial de levadura circular atrapado en el bloque de agarosa[44]. Los bloques fueron retirados y digeridos con NruI. En resumen, los bloques se incubaron previamente con tampón de enzima de restricción en exceso hasta una concentración final 1X durante 1 hora en hielo. Se eliminó el exceso de tampón dejando solo lo suficiente para cubrir los tapones, se añadió enzima de restricción a una concentración final de 100 U/mL y el tubo se incubó a 37 °C durante 4-5 horas. El YAC linealizado se retiró de los bloques por PFGE, cortado del gel como una tira y purificado como se describe a continuación.

Para el locus de Igκ humana se eligieron 3 BAC (RP11-344F17, RP11-1134E24 y RP11-156D9, Invitrogen), que cubrían una región de más de 300 kb de 5' Vκ1-17 a 3' KDE[45]. En las digestiones y análisis de secuencia se identificaron tres fragmentos superpuestos: de Vκ1-17 a Vκ3-77 (NotI de 150 kb con una superposición de ~ 14 kb), de Vκ3-7 a 3' de Cκ (NotI de 158 kb con superposición de ~40 kb) y de Cκ a 3' del KDE (PacI de 55 kb con

superposición de 40 kb). Las regiones superpuestas generalmente pueden favorecer la integración conjunta cuando se inyectan conjuntamente en los ovocitos[24].

Análisis en gel y purificación de ADN.

El ADN purificado de YAC y BAC se analizó mediante digestión de restricción y separación en geles de agarosa al 0.7% convencionales[46]. Los fragmentos más grandes, 50-200 kb, se separaron por PFGE (Biorad Chef Mapper[MR]) a 80 °C, utilizando Agarosa PFC al 0.8% en TBE al 0.5%, con un tiempo de conmutación de 2-20 segundos durante 16 h, 6V/cm, 10 mA. La purificación permitió una comparación directa de los fragmentos resultantes con el tamaño predicho obtenido del análisis de secuencia. Las alteraciones se analizaron por PCR y secuenciación.

Los YAC lineales, los YAC circulares y los fragmentos de BAC después de las digestiones, se purificaron por electroelución usando Elutrap[MR] (Schleicher y Schuell)[47] de tiras cortadas de geles de agarosa al 0.8% corridos convencionalmente o de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). La concentración de ADN generalmente era de varios ng/µL en un volumen de ~100 µL. Para fragmentos de hasta ~ 200 kb, el ADN se precipitó y se redisolvió en tampón de microinyección (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 100 mM pH 8 y NaCl 100 mM pero sin Espermina/Espermidina) a la concentración deseada.

La purificación de YAC circulares a partir de levadura se realizó usando resina de intercambio aniónico con base en sílice Nucleobond AX (Macherey-Nagel, Alemania). Brevemente, los esferoplastos se elaboraron usando zimoliasa o liticasa y se sedimentaaron[20]. Luego, las células se sometieron a lisis alcalina, uniéndose a la columna AX100 y eluyendo como se describe en el método de Nucleobond para un plásmido de baja copia. El ADN cromosómico de levadura contaminante se hidrolizó usando DNasa dependiente de ATP Plamid-Safe[MR] (Epicenter Biotechnologies) seguido de una etapa de limpieza final usando SureClean (Bioline). Luego se transformó una alícuota de células electrocompetentes DH10 (Invitrogen) con el YAC circular para obtener colonias de BAC. Para la microinyección, el inserto de ADN (150-200 kb), se separó del ADN del vector BAC (~10 kb) usando una etapa de filtración con sefarosa 4B-CL[48].

Derivación de ratas y cría.

El ADN purificado que codifica los loci de inmunoglobulina recombinante se resuspendió en tampón de microinyección con espermina 10 mM y espermidina 10 mM. El ADN se inyectó en ovocitos fertilizados a diversas concentraciones de 0.5 a 3 ng/µL.

Se inyectaron ADN plasmídico o ARNm que codifica ZFN específicos para genes de inmunoglobulina de rata en ovocitos fertilizados a diversas concentraciones de 0.5 a 10 ng/µL.

Se realizaron microinyecciones en las instalaciones de Caliper Life Sciences. Los animales de la cepa exogámica SD/Hsd (Tipo silvestre) se alojaron en jaulas microaisladoras estándar bajo protocolos aprobados de cuidado de animales en instalaciones de animales acreditados por la Asociación para la Evaluación y Acreditación de Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC). Las ratas se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 14-10 h con acceso libre a alimentos y agua. A las ratas hembra SD/Hsd de cuatro a cinco semanas de edad se les inyectó 20-25 UI de PMSG (Sigma-Aldrich) seguido 48 horas más tarde con 20-25 UI de hCG (Sigma-Aldrich) antes de la cría con machos SD/Hsd exogámicos. Se recogieron embriones fertilizados en etapa de 1 célula para la posterior microinyección. Los embriones manipulados se transfirieron a ratas hembras SD/Hsd seudopreñadas para llevarlas al parto.

Se analizaron ratas con Ig humana de múltiples características (IgH, Igκ e Igλ humanas en combinación con J KO, κ KO y λ KO de rata) y tipo silvestre, como control, a las 10-18 semanas de edad. Los animales fueron criados en Charles River en condiciones específicas libres de patógenos.

PCR y RT-PCR

Las ratas transgénicas se identificaron por PCR a partir del ADN de la cola o un fragmento de la oreja usando un minikit de ADN genómico (Bioline). Para las PCR de IgH <1 kb, se utilizó la mezcla maestra GoTaq Green (Promega) bajo las siguientes condiciones: 94 °C durante 2 minutos, 32 x (94 °C por 30 segundos, 54-67 °C (véase la Tabla complementaria 1 para los cebadores y las temperaturas específicas de hibridación) 30 segundos, 72 °C durante 1 min), 72 °C durante 2 min. Para las PCR de IgH >1kb se usó KOD polimerasa (Novagen) bajo las siguientes condiciones: 95 °C durante 2 minutos, 32 x (95 °C durante 20 segundos, 56-62 °C (Tabla complementaria 1) durante 20 segundos, 70 °C durante 90 segundos), 70 °C durante 2 min. Para PCR de Igκ e Igλ, todas <1 kb, se usaron las condiciones anteriores, excepto la extensión a 72 °C durante 50 segundos.

El ARN se extrajo de la sangre usando el kit para sangre RiboPure (Ambion) y para la extracción de ARN del bazo, la médula ósea o los ganglios linfáticos se utilizó el mini kit RNASpin. (GE Healthcare). El ADNc se elaboró usando Oligo dT y transcriptasa inversa Promega a 42 °C durante 1 hora. Las reacciones de PCR de GAPDH (oligos 429-430) determinaron la concentración.

Las RT-PCR se configuraron usando cebadores líderes VH con cebadores μCH2 de rata o γCH2 de rata (Tabla 1 complementaria). La amplificación con la mezcla maestra GoTaq Green fue de 94 °C durante 2 minutos, 34 x (94 °C durante 30 segundos, 55-65 durante 30 °C segundos, 72 °C durante 50-60 segundos), 72 °C durante 2 minutos. Los productos de PCR del tamaño esperado se purificaron mediante gel o QuickClean (Bioline) y se secuenciaron directamente o se clonaron en pGemT (Promega).

Purificación de proteínas

La IgM se purificó en una matriz de afinidad anti-IgM (BAC B.V., Países Bajos, CaptureSelect # 2890.05) como se describe en el protocolo. De manera similar, se purificaron Igκ e Igλ humanas en una matriz de afinidad de cadena anti-L (CaptureSelect anti-Igκ # 0833 y anti-Igλ, # 0849) de acuerdo con el protocolo.

Para la purificación de IgG de rata, se usó agarosa de proteína A[29] y proteína G (Innova, Cambridge, Reino Unido, # 851-0024 y # 895-0024). El suero se incubó con la resina y se facilitó la unión a fosfato de sodio 0.1 M pH 7 para la proteína G y pH 8 para la proteína A con una mezcla suave[22]. Las columnas polyprep (Bio-Rad) se empacaron con la mezcla y se lavaron ampliamente con PBS pH 7.4. El tampón de elución fue de citrato de sodio 0.1 M pH 2.5 y el tampón de neutralización fue Tris-HCl 1 M pH 9.

La electroforesis se realizó en SDS-PAGE al 4-15% y se usó azul brillante de Coomassie para la tinción. Los estándares de PM fueron el marcador de proteína preteñido HyperPage (# BIO-33066, Bioline).

Análisis por citometría de flujo y FISH

Las suspensiones celulares se lavaron y se ajustaron a 5 x 10^5 células/100 μL en PBS-BSA al 1%-Azida al 0,1%. Se identificaron diferentes subconjuntos de células B utilizando mAb de ratón marcado con FITC anti-IgM de rata (MARM 4, Jackson Immunoresearch Laboratories) en combinación con mAb conjugado con PE CD45R anti-células B (B220 de rata) (His 24, BD biosciences) o mAb conjugado con PE anti-IgD (MARD-3, Abd Serotec). Para el análisis se utilizó un citómetro de flujo FACS CantoII y el software FlowJo (Becton Dickinson, Pont de Claix, Francia).

La hibridación *in situ* con fluorescencia se llevó a cabo en linfocitos de sangre fijados usando BAC purificados de la región C de IgH e IgL como se describió[49].

Inmunización, fusión celular y medición de afinidad.

Las inmunizaciones se realizaron con 125 μg de PG en CFA, 150 μg de hGHR en CFA, 200 μg de Tau/KLH en CFA, 150 μg de HEL en CFA, 150 μg de OVA en CFA en la base de la cola y las células de los ganglios linfáticos ilíacos mediales se fusionaron con células de mieloma P3X63Ag8.653 de ratón 22 días después como se describió[50]. Para inmunizaciones múltiples, se administró proteína 125 μg de PG o HEL, o 100 μg de hGHR o CD14 en adyuvante GERBU (www.Gerbu.com) por vía intraperitoneal de la siguiente manera: día 0, día 14, día 28 y día 41 sin adyuvante, seguido de fusión de células del bazo con células P3x63Ag8.653, 4 días después[49].

La cinética de unión se analizó mediante resonancia de plasmón superficial usando un Biacore 2000 con los antígenos inmovilizados directamente como se describió[23].

Tabla complementaria 1

Condiciones de PCR* y RT-PCR** para detectar la integración y expresión de IgH e IgL humana			
IgH	Cebadores	Temp. de hibridación (Tm-5)	Tamaño del fragmento
Hyg (5' BAC6)	Hyg 3'F - 459	54 °C	~ 400 pb
V4-34 (BAC6)	205-206	65 °C	~ 1 kb
V4-28 (BAC6)	203-204	65 °C	~ 1 kb
V3-11 (BAC6-BAC3 superpuesto)	448-461	60 °C	~ 500 pb
V1-8 (BAC3)	371-372	60 °C	~ 300 pb
V4-4 (BAC3)	393-396	60 °C	~ 750 pb
V6-1 (BAC3-Annabel)	359-360	65 °C	~ 350 pb
JH (Annabel)	368-369	62 °C	~ 250 pb
μ-γ1 (Annabel)	583-535	62 °C	~ 3 kb
Ura (3' Annabel)	241-253	56 °C	~ 3 kb
Igκ	Cebadores	Temp. de hibridación (Tm-5)	Tamaño del fragmento
KDE	313-314	66 °C	~ 600 pb

(continuación)

Condiciones de PCR* y RT-PCR** para detectar la integración y expresión de IgH e IgL humana			
Igκ	Cebadores	Temp. de hibridación (Tm-5)	Tamaño del fragmento
cKapa	307-308	64 °C	~ 600 pb
V4-1	333-334	60 °C	~ 300 pb
V1-5	329-330	64 °C	~ 400 pb
V1-6	331-332	60 °C	~ 300 pb
V3-7	309-310	66 °C	~ 700 pb
V3-15	311-312	66 °C	~ 500 pb
Igλ	Cebadores	Temp. de hibridación (Tm-5)	Tamaño del fragmento
V3-27	215-216	67 °C	~ 400 pb
V3-19	213-214	67 °C	~ 700 pb
V2-14	211-212	67 °C	~ 400 pb
V medio	168-169	65 °C	~ 500 pb
JLambda	162-163	67 °C	~ 800 pb
cLambda	170-171	67 °C	~ 500 pb
potenciador	172-173	67 °C	~ 400 pb
* Para la extracción de ADN de cortes de la oreja y la cola se usó el Mini Kit de ADN genómico (Bioline). Para las PCR se uso 1 kb o menos de tamaño, de mezcla maestra GoTaq Green (Promega) bajo las siguientes condiciones: 94 °C durante 2 minutos, 32 x (94 °C durante 30 segundos, Tm-5 (abajo) durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto [50 segundos para Igκ/λ]), 72 °C durante 2 min. Las temperaturas de hibridación se ajustaron con el cebador más bajo Tm 5 °C (www.sigmagenosys.com/calc/DNACalc.asp). Para las PCR > 1 kb se usó KOD polimerasa (Novagen) bajo las siguientes condiciones: 95 °C durante 2 minutos, 32 x (95 °C durante 20 segundos, Tm5 durante 20 segundos, 70 °C durante 90 segundos), 70 °C durante 2 minutos.			

IgH	Cebadores	Temp. de hibridación (Tm-5)	Tamaño del fragmento
VH1 Líder	390	65 °C	↓
VH2 Líder	391	65 °C	↓
VH3 Líder	392	65 °C	↓
VH4 Líder	393	60 °C	↓
VH6 Líder	394	65 °C	↓
VH4-39 Líder	761	55 °C	↓
μCH2 de rata	345	↑	~ 1 kb
□CH2 de rata	682	↑	~ 800 pb

Ig□	Cebadores	Temp. de hibridación (Tm-5)	Tamaño del fragmento
HuVK1 Líder	400/474	63 °C	↓
HuVK3 Líder	401/475	63 °C	↓
HuVK4 Líder	476	63 °C	↓
HuVK5 Líder	477	63 °C	↓
Región C Hu□	402	↑	~ 600 pb
HuVL2 Líder	388/**4**78	58 °C	↓
HuVL3 Líder	398/479/**4**80/**4**82/483/481/**484**	58 °C	↓
HuVL4 Líder	**4**85	58 °C	↓
Región C Hu□□	387	↑	~ 600 pb
** El ARN se extrajo de la sangre usando el kit de sangre RiboPure (Ambion). El ARN extraído del bazo, la médula ósea o los ganglios linfáticos utilizó el mini kit RNASpin (GE Healthcare). El ADNc se elaboró usando Oligo dT y transcriptasa inversa Promega a 42 °C durante 1 hora. Las PCR que usan la mezcla maestra GoTaq Green se configuraron de la siguiente manera: 94 °C durante 2 minutos, 34 x (94 °C durante 30 segundos, Tm-5 durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto [50 segundos para Igκ/λ]), 72 °C durante 2 min.			

Cebadores

Número	Secuencia de Oligonucleótidos 5'-3'
162	GGGGCCAAGGCCCCGAGAGATCTCAGG
163	CACTGGGTTCAGGGTTCTTTCCACC
168	GTGGTACAGAAGTTAGAGGGGATGTTGTTCC
169	TCTTCT ACAAGCCCTTCT AAGAACACCTGG
170	AGCACAATGCTGAGGATGTTGCTCC
171	ACTGACCCTGATCCTGACCCTACTGC
172	AAACACCCCTCTTCTCCCACCAGC
173	CGCTCATGGTGAACCAGTGCTCTG
203	GCTATTTAAGACCCACTCCCTGGCA
204	AAAACCTGCAGCAAGGATGTGAGG
205	GCTCCTTCAGCACATTTCCTACCTGGA
206	CCATATATGGCAAAATGAGTCATGCAGG
211	CTCTGCTGCTCCTCACCCTCCTCACTCAGG
212	GAGAGTGCTGCTGCTTGTATATGAGCTGCA
213	TGGCTCACTCTCCTCACTCTTTGCATAGGTT
214	GATGGTTACCACTGCTGTCCCGGGAGTTAC
215	ATCCCTCTCCTGCTCCCCCTCCTCATTCTCTG
216	TGATGGTCAAGGTGACTGTGGTCCCTGAGCTG
238	AACAAGTGCGTGGAGCAG
241	GTACTGTTGACATTGCGAAGAGC
243	TGGTTGACATGCTGGCTAGTC
253	TGTCTGGCTGGAATACACTC
275	AAATGAGCTTCAAATTGAGAAGTGACGCAAGCATCAATGGTATAATGTCC AGAGTTGTGAGGCCTTGGGGACTGTGTGCCGAACATGCTC
276	CCAGCACTGTTCAATCACAGTATGATGAGCCTAATGGGAATCCCACTAGG CTAGTCTAGTCACCACATTAAAGCACGTGGCCTCTTATCG
278	TGACCATTGCTTCCAAGTCC
307	GAGGAAAGAGAGAAACCACAGGTGC
308	CACCCAAGGGCAGAACTTTGTTACT
309	TGTCCAGGTA TGTTGAAGAA TGTCCTCC
310	TGGACTCTGTTCAACTGAGGCACCAG
311	GGCCTTCATGCTGTGTGCAGACTA
312	CAGGTCGCACTGATTCAAGAAGTGAGT
313	TTCAGGCAGGCTCTTACCAGGACTCA
314	TGCTCTGACCTCTGAGGACCTGTCTGTA
329	TCACGTGACTGTGATCCCTAGAA
330	CACTGTTATGCCAACTGAACAGC
331	CGTAGCAGTCCCCATCTGTAATC
332	ATGTCAGAGGAGCAGGAGAGAGA
333	CACGCCTCACA TCCAA T ATGTT A
334	AT ACCCTCCTGACA TCTGGTGAA
345	GCTTTCAGTGATGGTCAGTGTGCTTATGAC
346	TGGAAGACCAGGAGAT ATTCAGG
359	TTGCTTAACTCCACACCTGCTCCTG
360	TGCTTGGAACTGGA TCAGGCAGTC
368	CACCCTGGTCACCGTCTCC
369	AGACAGTGACCAGGGTGCCAC
371	TGAGGAACGGATCCTGGTTCAGTC
372	ATCTCCTCAGCCCAGCACAGC
383	CCTCCCATGATTCCAACACTG
384	CTCACCGTCCACCACTGCTG
385	CTGTGCCACAAACATGCAAAGATAAGTTCCATGTGACAAGTCTGAACTCA GTGTTGGAATCATGGGAGGCGGCCGCGTTATCTATGCTGTCTCACCATAG
387	TGCTCAGGCGTCAGGCTCAG
388	TGCTCAGGCGTCAGGCTCAG
390	ATGGACTGGACCTGGAGGATCC
391	TCCACGCTCCTGCTGCTGAC
392	ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGG
393	TGAAACACCTGTGGTTCTTCC
394	TCATCTTCCTGCCCGTGCTGG
396	GACTCGACTCTTGAGGGACG
398	ATGTGGCCACAGGCTAGCTC
400	ATGAGGGTCCCCGCTCAG
401	ATGGAAGCCCCAGCTCAGC

(continuación)

Número	Secuencia de Oligonucleótidos 5'-3'
402	CCTGGGAGTTACCCGATTGG
412	GGCGCGCCAAGCATCATGTCCTACCTGGCTG
414	CAAAGTACGTGGCACCTCCCTCGTCTTTCTTCCTCCTGCTCCAGCCAGGTA GGACATGATGCTTGGCGCGCCGTTATCTATGCTGTCTCACCATAG
429	CAGTGCCAGCCTCGTCTCAT
430	AGGGGCCATCCACAGTCTTC
448	CTTCACTGTGTGTTCTTGGGATAC
459	GTGTAATGCTTTGGACGGTGTGTTAGTCTC
461	GCATAGCGGCGCGCCAAGCATCATGTCCTACCTGGCTG
474	GACATGAGAGTCCTCGCTCAGC
475	AAGCCCCAGCGCAGCTTC
476	ATGGTGTTGCAGACCCAGGTC
477	GTCCCAGGTTCACCTCCTCAG
478	TCCTCASYCTCCTCACTCAGG
479	CGTCCTTGCTTACTGCACAG
480	AGCCTCCTTGCTCACTTTACAG
481	CCTCCTCAYTYTCTGCACAG
482	GCTCACTCTCCTCACTCTTTGC
483	CCTCCTCTCTCACTGCACAG
484	GCCACACTCCTGCTCCCACT
485	ATGGCCTGGGTCTCCTTCTAC
488	ATTACTACTACTACTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTC ACCGTCTCCTCAGGAAGAATGGCCTCTCCAGGTC
490	CTGTCGTTGAGATGAACCCCAATGTGAG
534	GGAACTGATGTGATCTCAGTCACACAGCTAATGCAAAGGTCAGCAGGCT GTTTACTGCCTGGAGGTTCATCGCCCAATTCCAAAGTCAC
535	CTAGTCTGCATGGGTCTCCGCAAAC
550	CTGGTATAATCATAAGTCTCCACTTAATAGTTCTGTAGACAGAATCTTCAT TTAGACTTACAGACCGCGGCCGCACCGCAGGGTAATAACTG
561	GCAACCCTTCTTGCCACTCATGTCCCAGCTCTCACCATGTGACATAGCCTG TTAACAATTCGGTCGAAAAAAGAAAAGGAGAG
562	AATGTTCTTAGTATATATAAACAAGCTACTCCCAATTCATAGTCAACTAA GTTAACATTCCACATGTTAAAATAGTGAAGGAG
566	TTAACAGGCTATGTCACATGGTGAGAGCTGGGACATGAGTGGCAAGAAG GGTTGCCAGACTCCCCCTTTACCTCTATATCGTGTTC
570	CTTAGTTGACTATGAATTGGGAGTAGCTTGTTTATATATACTAAGAACATT TGTCAGAAGCTCTTTCTTGTTTATTCCCAGTTTGC
583	CATGTCCGTATGTTGCATCTGC
682	GGGAAGATGAAGACAGATG
761	TGGAGTGGATTGGGAGT

Resultados

Los loci IgH e IgL humanas

La construcción de los loci de Ig humanos empleó tecnologías establecidas para ensamblar grandes segmentos de ADN usando YAC y BAC[16,19, 24-26]. Como las modificaciones múltiples de BAC en *E. coli* frecuentemente eliminaban regiones repetitivas tales como secuencias de cambio y potenciadores, se desarrolló un método para ensamblar secuencias con extremos superpuestos en *S. cerevisiae* tal como YAC circular (cYAC) y, posteriormente, convertir dicho cYAC en un BAC. Las ventajas de los YAC incluyen su gran tamaño, la facilidad de alteraciones homólogas en el huésped de levadura y la estabilidad de la secuencia, mientras que los BAC propagados en *E. coli* ofrecen las ventajas de una preparación fácil y un gran rendimiento. Además, el mapeo de restricción detallado y el análisis de secuenciación se pueden lograr mejor en BAC que en YAC.

El análisis de secuencia y las digestiones identificaron grupos de genes de interés y aseguraron la integridad y funcionalidad del locus para asegurar la reordenación y el cambio de ADN en una amplia región. El diseño de la IgH humana (segmentos VH, D y JH humanos seguidos de genes C de rata), loci de Igκ e Igλ se representan en la Figura 1a-c. Como se mostró anteriormente, las regiones superpuestas generalmente pueden favorecer la integración conjunta cuando se inyectan conjuntamente en los ovocitos[24]. De este modo, la inserción de BAC6-VH3-11, un fragmento de AsiSI-AscI de 182 kb, con BAC3, un fragmento de NotI de 173 kb, y BAC3-1N12M5I8 (Annabel de Hu-Rata), un fragmento de NotI de 193 kb, condujo a la reconstitución de un loci de IgH transgénico completamente funcional en el genoma de la rata. Del mismo modo, el locus de Igκ humano se integró mediante superposiciones homólogas. El locus de Igλ humano se aisló intacto como un YAC de ~300 kb y también se insertó completamente en un cromosoma de rata. El éxito de la integración se identificó mediante un análisis de transcripción que mostró recombinaciones V(D)J-C desde el extremo más 5' hasta más 3' del locus inyectado. Se identificaron múltiples copias mediante qPCR (no se muestra) y es probable que ocurrieran integraciones de la

cabeza a la cola. En todos los casos, los animales transgénicos con integraciones de un solo sitio se generaron mediante reproducción.

Reproducción para homocigosidad

La derivación de ratas transgénicas por microinyección de ADN en ovocitos, su reproducción e inmunización es comparable a la del ratón. Sin embargo, la tecnología de ZFN para obtener genes desactivados solo se ha informado recientemente[11, 13]. Se ha descrito el silenciamiento del locus de IgH de rata por eliminación de J_H usando tecnología ZFN KO[12] y se está preparando un manuscrito que describe el silenciamiento de los loci de IgL de rata, el direccionamiento de Cκ y la eliminación de genes J-Cλ. Se derivaron múltiples fundadores con loci de Ig humano integrados y producción de Ig endógena silenciada; todos analizados por PCR y FISH con integración completa de translocus seleccionada y entrecruzada (Tabla 2). Varias ratas fundadoras portaban bajos números de copias de translocus; con el gen C de rata BAC en OmniRat probablemente integrado completamente en 5 copias según lo determinado por qPCR de productos de Cμ y Cα (no mostrados). La identificación por FISH de la inserción de una sola posición en muchas líneas confirmó que la propagación o la integración múltiple de mezclas de BAC eran raras; una ventaja para la reproducción para homocigosidad, que se logró.

Tabla 2: Líneas de ratas generadas: integración transgénica, desactivación y uso de genes

Línea de rata	V_H humano		C_H de rata	Igk humana	Igl humana	ZFN KO			FISH
	BAC6-VH3-11182 kb	BAC3 173 kb	(Annabel) 193 kb	BAC 300 kb	Igl YAC 300 kb	J_H KO	Igκ KO	Igγ KO	Cromosoma de rata
HCl4	√	√	√						5q22
OmniRat	√	√	√	√	√	√	√	√	homocigoto KO
LC#79				√					17
LC#6.2					√				6q23
#117						√			6q32
#23							√		4
#35								√	11

Las ratas que portaban los transloci humanos individuales, IgH, Igκ e Igλ, se cruzaron con éxito hasta la homocigosidad con ratas con locus de Ig KO. Esto produjo una nueva línea con múltiples características altamente eficiente (OmniRat[MR]) con regiones V_H-D-J_H humanas de más de 400 kb que contienen 22 V_H funcionales y una región C de rata de ~116 kb. El reordenamiento del ADN, los niveles de expresión, el cambio de clase y la hipermutación fue muy similar entre los diferentes fundadores y comparable a las ratas tipo silvestre. Este es probablemente el resultado de la región constante de rata asociada que acomoda varios C y con la región 3'E (control de potenciador) en configuración auténtica.

Desarrollo de células B en el ambiente desactivado

Para evaluar si los loci de Ig humanos introducidos eran capaces de reconstituir el desarrollo de células B normales, se realizaron análisis de citometría de flujo. Se analizaron etapas de diferenciación particulares en linfocitos de bazo y médula ósea (Figura 2), que previamente mostraron una falta de desarrollo de células B en ratas JKO/JKO[12], y ninguna expresión de IgL correspondiente en animales κKO/κKO, así como en λKO/λKO (datos no mostrados). Lo más sorprendente fue la recuperación completa del desarrollo de células B en OmniRat en comparación con animales de tipo silvestre, con números similares de linfocitos B220 $(CD45R)^+$ en la médula ósea y el bazo. La expresión de IgM en una gran proporción de células B $CD45R^+$ marcó un sistema inmunitario completamente reconstituido. La separación del tamaño y la forma de las células del bazo era indistinguible entre OmniRat y animales tipo silvestre y, por lo tanto, se restauró con éxito en las ratas transgénicas que expresan idiotipos humanos con la región C de rata. Además, la pequeña población de linfocitos sIgG+ estaba presente en OmniRat (Figura 2 derecha).

El análisis de otros tejidos de linfocitos OmniRat mostró que no se podían distinguir de los controles de tipo silvestre y, por ejemplo, los subconjuntos de células T se conservaron por completo (datos no mostrados), lo que respalda aún más la idea de que la función inmune óptima ha sido completamente restaurada.

Diversas transcripciones de cadenas H y L humanas

Se llevó a cabo un análisis transcripcional extenso usando linfocitos sanguíneos o células de bazo de ratas transgénicas con loci de Ig endógenos funcionales. La RT-PCR del grupo V_H humano específico hacia los cebadores inversos Cμ o Cγ mostró el uso de V_HDJ_H humano. Para el grupo de análisis de la cadena L, se usaron cebadores directos Vκ o Vλ humanos específicos con cebadores inversos Cκ o Cλ. Los resultados (Tabla 3) mostraron el uso

de todos los genes de V_H humanos integrados considerados funcionales[27] en combinación con el uso diverso de segmentos D y todos los segmentos J_H.

| | IgH V | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | IgH D | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

El análisis de cambio de clase e hipermutación (Figura 3) en el ambiente de JKO/JKO mostró que estos mecanismos esenciales y altamente deseables son completamente operativos en OmniRat. La amplificación de los productos de cambio de IgG de los PBL reveló una tasa extensa de mutación (> 2 cambios de aa) en la mayoría de las células, ~80%, y en cantidades casi iguales de cadenas H de γ1 y γ2b. También se identificó un pequeño porcentaje de secuencias de cambio trans, γ2a y 2c (Figura 3), lo que respalda la observación de que el translocus es igualmente activo, pero que proporciona (V_H-D-J_H) humanos, como el locus de IgH endógeno[28]. El número de secuencias de cadenas L de Igγ e Igκ humanas mutadas es de ~ 30% y, por lo tanto, considerablemente menor que las cadenas H de IgG. La razón es la amplificación general de la cadena L de todas las células productoras en lugar de la IgG^+ o las células plasmáticas diferenciadas.

Niveles de Ig en suero

Para obtener información inequívoca sobre la producción de anticuerpos, se compararon la calidad y cantidad de Ig en suero de OmniRat y animales de tipo silvestre normales. La purificación de IgM e IgG separadas en SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 4) mostró el tamaño esperado, ~75 kDa para μ, ~55 kDa para cadenas H de γ, y ~25 kDa para cadenas L, que parecían indistinguibles entre los animales OmniRat y los de tipo silvestre. Se determinó que el rendimiento de Ig del suero estaba entre 100-300 μg/mL para IgM y 1-3 mg/mL para IgG para ambos varios OmniRat y animales de tipo silvestre. Sin embargo, como la purificación de IgG de rata en la proteína A o G se considera subóptima[29], los niveles de Ig de rata pueden estar subrepresentados. Teniendo en cuenta que estas ratas jóvenes (~3 meses de edad) fueron alojadas en instalaciones libres de patógenos y no habían sido inmunizadas, esto se compara bien con los niveles de IgM de 0.5-1 mg/mL y los niveles de IgG de varios mg/mL reportados para ratas mantenidas en instalaciones abiertas[30, 31]. Curiosamente, se pudo visualizar la movilidad específica de clase de los isotipos de IgG de rata en SDS-PAGE como se demostró para monoclonales[29]. En las separaciones de IgG (Figura 4b), es visible una banda distinta inferior de cadena H de γ en Ig de tipo silvestre pero no en OmniRat. Esta banda se ha atribuido a las cadenas H de γ2a, que no están presentes en el translocus OmniRat (HC14). Como los niveles de IgG son similares entre los animales OmniRat y los de tipo silvestre, se asumió que el cambio de clase es igualmente eficiente. La razón por la que la falta de Cγ2a en las OmniRat no es limitante puede ser que varias copias del locus transgénico aumentan favorablemente el nivel de productos de cambio. La purificación de Igκ e Igλ humanas mediante la captura con anti-cadena L también fue exitosa (Figura 4c y d) y las bandas de cadena H y L predichas tenían el tamaño esperado. La confirmación de los títulos de IgM/G también se obtuvo mediante ELISA, que determinó la distribución del isotipo de tipo silvestre y OmniRat e identificó cantidades comparables de IgG1 e IgG2b (no mostradas).

Una comparación directa de los títulos de la cadena L de Ig humana en las valoraciones en fase sólida (Figura 4e y f) reveló niveles 5-10 veces más bajos en OmniRat que en el suero humano. Sin embargo, esto se esperaba ya que el suero de control humano de adultos maduros a veces puede contener niveles de Ig más de 10 veces más altos que en niños hasta la adolescencia[32], lo que sería similar a los títulos de Igκ e Igλ humanos en ratas jóvenes. Curiosamente, las ratas de tipo silvestre producen muy poca Igλ endógena, mientras que las ratas transgénicas pueden expresar eficientemente ambos tipos de cadena L humana, Igκ e Igλ.

IgG completamente humana específica de antígeno

Se llevaron a cabo varias fusiones celulares, usando un esquema de inmunización rápida y recogiendo ganglios linfáticos o, alternativamente, usando inmunizaciones de refuerzo y células de bazo (Tabla 2). Por ejemplo, se obtuvo un número considerable de hibridomas estables después de una inmunización con progranulina humana (PG) y fusión de mieloma 22 días después. Aquí se observó crecimiento celular en ~3.520 y ~1.600 pozos en clones de control SD y de hibridoma de OmniRat, respectivamente. La IgG específica anti-progranulina, caracterizada por mediciones de biosensores, fue producida por 148 clones de OmniRat. La dilución limitante, para excluir pozos mixtos, y repetir las mediciones de afinidad revelaron que los clones de OmniRat conservan su especificidad antigénica. Una comparación de las tasas de asociación y disociación de anticuerpos de clones de SD y de OmniRat mostró afinidades similares entre 0,3 y 74 nM (Tabla 4 y datos no mostrados). Las inmunizaciones únicas con receptor de hormona de crecimiento humano (hGHR), receptor TAU acoplado a hemocianina de lapa de ojo de cerradura (TAU/KLH), lisozima de huevo de gallina (HEL) u ovoalbúmina (OVA), seguido de fusiones de ganglios linfáticos también produjeron muchos anticuerpos humanos de alta afinidad a menudo en números similares en comparación con el tipo silvestre.

Además, las inmunizaciones de refuerzo convencionales con PG humana, hGHR, CD14 humano y HEL dieron como resultado altas afinidades (intervalo pM) de IgG con idiotipos humanos. Las OmniRat siempre mostraron el aumento esperado de títulos de 4 a 5 log de IgG sérica específica de antígeno, similar y tan pronunciada como las ratas de tipo silvestre (Tabla 4a). Aunque los resultados podrían variar de un animal a otro, se obtuvieron cantidades comparables de hibridomas que producen anticuerpos específicos de antígeno con afinidades similarmente altas de animales de tipo silvestre (SD y otras cepas) y OmniRat. En la Tabla 4b se presenta un resumen de los clones de fusión de células de bazo y ganglios linfáticos productores de IgG individuales, que muestran sus diversas características y afinidades de V_H-D-J_H humana, Vκ-Jκ humana o Vλ-Jγ. Los resultados de inmunización y fusión mostraron que las afinidades muy por debajo de 1 nM (determinado por análisis de biosensores) se obtuvieron

frecuentemente de OmniRat inmunizadas con antígenos PG, CD14, Tau, HEL y OVA. En resumen, los hibridomas específicos de antígeno de OmniRat podrían generarse tan fácilmente como a partir de animales de tipo silvestre que producen numerosos mAb con afinidad sub-nanomolar incluso después de una única inmunización.

Tabla 4a. Diversos hibridomas de IgG de rata específicos de antígeno con idiotipos completamente humanos[a]

Animal	Antígeno	Células*	fusiones	título	híbridos	IgG**	Kd***
SD	PG	LN	1	38400	3520	38	0.3-1.0 nM
OmniRat	PG	LN	1	12800	1600	148	0.7-2.4 nM
SD	PG	SP	1	51200	8000	29	ND
OmniRat	PG	SP	1	51200	36000	24	ND
OmniRat	hGHR	LN	3	4800	704-1024	18, 3, 2	ND
SD	hGHR	SP	1	204800	53760	230	<0.07-0.4 nM
OmniRat	hGHR	SP	1	76800	53760	7	0.16-2.4 nM
OmniRat	CD14	SP	2	102400	2800-3500	54, 14	<0.1-0.2 nM
SD	TAU/K LH	LN	1	20000	1728	99#	0.6-2.4 nM
OmniRat	TAU/K LH	LN	1	4800	1880	118#	0.5-3.2 nM
SD	HEL	LN	1	12800	1564	26	0.02-0.1 nM
OmniRat	HEL	LN	3	25600	288-640	0, 2, 7	0.6-1.5 nM
SD	HEL	SP	1	6400	30720	0	ND
SD	OVA	LN	1	9600	1488	10	1.1-4.8 nM
OmniRat	OVA	LN	4	8000	512-2240	0, 30, 0, 1	0.7-1.5 nM

* los números de células fueron 3-9 x 10^7 por fusión
** especificidad de antígeno confirmada por análisis de biosensor
*** intervalo de 5 afinidades más altas
# 8 mAb fueron específicos para el péptido Tau

Tabla 4b

Antígeno	Células de fusión*	Clon	K_D (nM)	IGHV	Cambios de AA	IGHD	IGHJ	CDR3	IGκ/λV	Cambios de AA	IGκ/λJ
PG	LN	8080.1B2	0.7	4-31	2	7-27	3	CATGTGEDAFDIW	LV3-10	1	2 o 3
PG	LN	8080.2B3	1.4	3-23	1	3-3	4	CAKGIGSLITPPDYW	LV3-19	2	2 o 3
hGHR	LN	9046.8A3	2.4	1-2	6	6-19	3	CARVGQWLNAFDIW	LV2-14	9	2 o 3
hGHR	LN	9046.6E10	4.2	1-2	7	3-16	4	CARRGDGAFDYW	LV2-23	5	2 o 3
TAU/KLH	LN	8898.2B10	0.8	4-39	5	3-22	4	CARHRYYYDSRGYFIFDYW	KV4-1	0	2
OVA	LN	9477.2F4	2.7	3-23	6	1-26	4	CAKEWGYGGSYPFDYW	KV1-17	1	5
OVA	LN	9477.2A9	3.9	3-11	5	3-10	4	CARAYYYGSGSSLFDYW	KV1-6	12	4
HEL	SP	1H2	0.9	3-23	15	6-19	4	CAKREYSSDWYPFDHW	KV3-11	1	2
HEL	SP	3C10	0.8	6-1	1	6-19	1	CAREGSSGWYGFFQHW	KV1-5	0	5
β-gal	SP	5005.6C1	nd	6-1	5	2-21	4	CARTPRLGLPFDYW	KV1-12	0	4

[a] OmniRat (HC14/Huκ y/o Huλ/JKOJKO/KKOKKO) y las ratas SD de control se inmunizaron con progranulina (PG) humana, receptor de hormona de crecimiento humano (hGHR), CD14 humano, péptido Tau (TAU-KLH), lisozima de huevo de gallina (HEL), ovoalbúmina (OVA) o β-galactosidasa (β-gal).
* Los ganglios linfáticos (LN) o las células del bazo (SP) se fusionaron después de la administración única o múltiple de antígeno, respectivamente.

Discusión

Una combinación de genes humanos y de rata para ensamblar un nuevo locus de IgH ha dado como resultado una expresión casi normal de anticuerpos altamente eficiente con idiotipos humanos. Además, la integración de los loci de Igκ e Igλ humanos reveló que la Ig quimérica con especificidad completamente humana se produce fácilmente y que la asociación de regiones C de rata con cadenas L humanas no es perjudicial. Las ventajas de usar parte del locus de IgH de rata son que las regiones C específicas de la especie y los elementos de control del potenciador se mantienen en su configuración natural, trasplantando esencialmente solo la región V_HDJ_H humana diversa. Además, la expresión de anticuerpos con regiones Fc de rata permite el ensamblaje normal del receptor de células B y la activación óptima de la ruta de señalización secuencia abajo esencial para el inicio de respuestas inmunes altamente eficientes. En particular, la calidad de una respuesta inmune al desafío del antígeno se basa en acciones combinadas de muchos componentes de señalización y modificadores asociados al receptor (véase: www_biocarta_com/pathfiles/h_bcrpathway.asp).

El enfoque de usar YAC y BAC, y el intercambio entre los dos, tiene ambas ventajas, velocidad y capacidad de verificar la integridad al hacer constructos de grandes regiones mediante la superposición de la homología. Varias ratas fundadoras portaban números bajos de copias de translocus; con el gen C de rata BAC en OmniRat probablemente integrado completamente en 5 copias según lo determinado por qPCR de productos de Cμ y Cα (no mostrados). La identificación por FISH de la inserción de una sola posición en muchas líneas (véase Tabla 1d) confirmó que la propagación o la integración múltiple de mezclas de BAC eran raras; una ventaja para la reproducción para homocigosidad, que se logró. Poco se sabía si las regiones superpuestas extensas se integrarían, como para mantener la funcionalidad completa, esencial para la reorganización del ADN. Anteriormente, se ha informado una integración superpuesta, pero para regiones mucho más pequeñas (<100 kb)[24, 33] y estos resultados sugieren que la integración deseada por homología o en tándem es un evento frecuente. Esto facilita sustancialmente la tecnología transgénica ya que no se debe realizar una laboriosa integración de YAC grandes en las células madre y su posterior derivación animal a partir de ellas debe realizarse[18,19]. Además, la tecnología de ZFN, también realizada mediante inyección de ADN[11,12], produjo cepas de Ig KO fácilmente y bien podría ser la tecnología de elección futura para las alteraciones y el reemplazo de genes. La expresión del gen de Ig endógena silenciada en OmniRat, que contiene el loci de IgH humana-rata e IgL humana, tiene la ventaja de que ninguna Ig de rata interferente o indeseable podría dar lugar a productos mixtos. Curiosamente, la inmunización y la generación de hibridoma en OmniRat que todavía producían Ig de tipo silvestre revelaron que muchos productos eran completamente humanos, IgH humana-rata e IgL humana, a pesar de los Ig KO incompletos. En el presente documento, a pesar de la gran cantidad de genes de V de tipo silvestre, fue notable que los genes humanos introducidos se amplificaran fácilmente y, por lo tanto, demostraran ser competidores de expresión eficientes. Esto está en línea con la observación de niveles de expresión generalmente buenos de todos los transgenes integrados, que compiten favorablemente con los loci endógenos. Anteriormente en ratones que expresaban un repertorio de anticuerpos humanos, las Ig KO eran esenciales, ya que se encontró poca expresión de productos humanos cuando se libera Ig de tipo silsestre[8,18].

Es posible que la producción de loci de Ig completamente humanos incluso en ratones Ig KO sea subóptima ya que se requieren secuencias de acción cis específicas de la cepa para la expresión de alto nivel. En el ratón, una región potenciadora secuencia abajo de Cα juega un papel vital en la recombinación de cambio de clase[34] y es probable que los elementos en esa región puedan facilitar la hipermutación[23]. Esta puede ser la razón por la cual las respuestas inmunes y la generación de diversos hibridomas a alta frecuencia pueden ser difíciles en ratones que transportan incluso un gran locus completamente humano[35, 36]. Como el locus quimérico de IgH humano-rata facilita los niveles cercanos de diferenciación y expresión de tipo silvestre en OmniRat, se puede concluir que la región C endógena de rata y, de hecho, la secuencia potenciadora 3' de ~30 kb de Cα están proporcionando un control óptimo del locus para expresar y madurar genes de V_H humano. Otra región, Cδ con su grupo de motivos de control 3'[26], se ha eliminado del BAC quimérico de la región C porque el silenciamiento o la falta de IgD no parecen reducir la función inmune[37 y las referencias allí citadas]. Normalmente, las células B maduras IgM+ IgD+ subregulan IgD tras el contacto con el antígeno, lo que inicia la recombinación de cambio de clase[37]. Por lo tanto, el cambio puede incrementarse sin el control de IgD, lo que está respaldado por el hallazgo de que las transcripciones de IgG y los niveles séricos son significativamente más bajos cuando la región Cδ se retiene en constructos transgénicos (datos no mostrados).

La producción de IgG específica en OmniRat es particularmente alentadora ya que se descubrió que en diversas inmunizaciones, los mAb con diversidad en secuencia y epítopo, comparables a lo que se produjo en controles de tipo silvestre, podían aislarse mediante fusión de bazo y ganglios linfáticos. En el gen V, la diversidad de D y J fue la esperada y se encontró que casi todos los segmentos se usaron productivamente como se predijo[27]. Esto estaba en marcado contraste con los ratones que portaban transloci completamente humanos en los que la expansión clonal de unas pocas células B precursoras producía poca diversidad[23]. Dado que el número de genes de V trasplantados es solo aproximadamente la mitad de lo que se usa en humanos, se anticipo encontrar respuestas inmunes restringidas y diversidad limitada al comparar OmniRat con animales de tipo silvestre. Sin embargo, este no fue el caso y una comparación de la diversidad de CDR3 en más de 1000 clones (se pueden proporcionar secuencias) reveló las mismas diferencias de unión extensivas en OmniRat que en animales de tipo silvestre. Las pocas combinaciones idénticas de segmentos genéticos se diversificaron aún más mediante adiciones o eliminaciones de

la secuencia N en las uniones V_H a D y/o D a J_H y también por hipermutación. Por lo tanto, está claro que la secuencia de la región C de la rata es altamente eficiente en el control de la reorganización del ADN y la expresión de V_HDJ_H humano. También se observó una gran diversidad para los loci de Igκ e Igλ humanos introducidos, similar a lo que se ha mostrado previamente en ratones [22, 23, 38]. Por lo tanto, se ha superado una eficiencia sustancialmente reducida en la producción de anticuerpos humanos a partir de ratones[7] en OmniRat, que diversifica las cadenas H reorganizadas de manera confiable y extensiva mediante cambio de clase e hipermutación para producir anticuerpos de alta afinidad en masa en lugar de ocasionalmente. El rendimiento de IgG transgénica y el nivel de hipermutación, utilizado de manera impresionante en mAb específicos de antígeno, mostraron que la diversificación clonal y el nivel de producción son similares entre OmniRat y animales de tipo silvestre. La generación rutinaria de especificidades de alta afinidad en el intervalo subnanomolar se logró incluso mediante diferentes inmunizaciones individuales y nuevamente se compara favorablemente con los animales de tipo silvestre; resultados que no se han mostrado en ratones transgénicos que producen repertorios de anticuerpos humanos a partir de loci completamente humanos[18].

En resumen, para maximizar la producción de anticuerpos humanos, un locus de IgH que utiliza genes humanos para la especificidad de anticuerpos pero genes de roedores para el control de la diferenciación y la alta expresión deben considerarse esenciales. La flexibilidad de la cadena L es una ventaja, ya que permite un ensamblaje de IgH/IgL humano altamente eficiente incluso cuando está presente Ig de tipo silvestre. Para aplicaciones terapéuticas, las cadenas H quiméricas se pueden convertir fácilmente en Ab completamente humanos mediante el reemplazo del gen de C sin comprometer la especificidad.

Ciertas modificaciones y mejoras se les ocurrirán a los expertos en la técnica tras una lectura de la descripción anterior. Debe entenderse que todas estas modificaciones y mejoras se han eliminado en este documento en aras de la concisión y la legibilidad, pero están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Referencias

1. Chan, A.C. & Carter, P.J. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. Nature reviews. Immunology 10, 301-316 (2010).

2. Enever, C, Batuwangala, T., Plummer, C. & Sepp, A. Next generation immunotherapeutics-honing the magic bullet. bullet. Current opinion in biotechnology 20, 405-411 (2009).

3. Brüggemann, M., Smith, J.A., Osborn, M.J. & Zou, X. Part I: Selecting and shaping the antibody molecule, Selection Strategies III: Transgenic mice, in Handbook of Therapeutic Antibodies. Ed. Dubel, S. Wiley-VHC, 69-93 (2007).

4. Green, L.L. Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. Journal of immunological methods 231, 11-23 (1999).

5. Ishida, I. et al. Production of human monoclonal and polyclonal antibodies in TransChromo animals. Cloning and stem cells 4, 91-102 (2002).

6. Kuroiwa, Y. et al. Cloned transchromosomic calves producing human immunoglobulin. Nature biotechnology 20, 889-894 (2002).

7. Lonberg, N. Human antibodies from transgenic animals. Nature biotechnology 23, 1117-1125 (2005).

8. Bruggemann, M. et al. A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86, 6709-6713 (1989).

9. Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, R. & Rajewsky, K. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. Nature 350, 423-426 (1991).

10. Davies, N.P. & Bruggemann, M. Extension of yeast artificial chromosomes by cosmid multimers. Nucleic acids research 21, 767-768 (1993).

11. Geurts, A.M. et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. Science 325, 433 (2009).

12. Menoret, S. et al. Characterization of immunoglobulin heavy chain knockout rats. European journal of immunology 40, 2932-2941 (2010).

13. Flisikowska, T. et al. Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases. PloS one 6, e21045 (2011).

14. Xian, J. et al. Comparison of the performance of a plasmid-based human Igκ minilocus and YAC-based human Igκ transloci for the production of a human antibody repertoire in transgenic mice. Transgenics, 333-343 (1998).

15. Anand, R. Yeast artificial chromosomes (YACs) and the analysis of complex genomes. Trends Biotechnol 10, 35-40 (1992).

16. Davies, N.P., Rosewell, I.R. & Bruggemann, M. Targeted alterations in yeast artificial chromosomes for inter-species gene transfer. Nucleic acids research 20, 2693-2698 (1992).

17. Zou, X., Xian, J., Davies, N.P., Popov, A.V. & Bruggemann, M. Dominant expression of a 1.3 Mb human Ig kappa locus replacing mouse light chain production. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 10, 1227-1232 (1996).

18. Mendez, M.J. et al. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. Nature genetics 15, 146-156 (1997).

19. Davies, N.P. et al. Creation of mice expressing human antibody light chains by introduction of a yeast artificial chromosome containing the core region of the human immunoglobulin kappa locus. Biotechnology (N Y) 11, 911-914 (1993).

20. Davies, N.P., Popov, A.V., Zou, X. & Brüggemann, M. Human antibody repertoires in transgenic mice: Manipulation and transfer of YACs. IRL Oxford, 59-76 (1996).

21. Lonberg, N. et al. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. Nature 368, 856-859 (1994).

22. Nicholson, I.C. et al. Antibody repertoires of four- and five-feature translocus mice carrying human immunoglobulin heavy chain and kappa and lambda light chain yeast artificial chromosomes. J Immunol 163, 6898-6906 (1999).

23. Pruzina, S. et al. Human monoclonal antibodies to HIV-1 gp140 from mice bearing YAC-based human immunoglobulin transloci. Protein engineering, design & selection : PEDS 24, 791-799 (2011).

24. Wagner, S.D., Gross, G., Cook, G.P., Davies, S.L. & Neuberger, M.S. Antibody expression from the core region of the human IgH locus reconstructed in transgenic mice using bacteriophage P1 clones. Genomics 35, 405-414 (1996).

25. Popov, A.V., Butzler, C., Frippiat, J.P., Lefranc, M.P. & Bruggemann, M. Assembly and extension of yeast artificial chromosomes to build up a large locus. Gene 177, 195-201 (1996).

26. Mundt, C.A. et al. Novel control motif cluster in the IgH delta-gamma 3 interval exhibits B cell-specific enhancer function in early development. J Immunol 166, 3315-3323 (2001).

27. Lefranc, M.-P. & Lefranc, G. The immunoglobulin factsbook. FactsBook Series, Academic Press, GB, 45-68 (2001).

28. Reynaud, S. et al. Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells. J Immunol 174, 6176-6183 (2005).

29. Bruggemann, M., Teale, C., Clark, M., Bindon, C. & Waldmann, H. A matched set of rat/mouse chimeric antibodies. Identification and biological properties of rat H chain constant regions mu, gamma 1, gamma 2a, gamma 2b, gamma 2c, epsilon, and alpha. J Immunol 142, 3145-3150 (1989).

30. Bazin, H., Beckers, A. & Querinjean, P. Three classes and four (sub)classes of rat immunoglobulins: IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c. European journal of immunology 4, 44-48 (1974).

31. McGhee, J.R., Michalek, S.M. & Ghanta, V.K. Rat immunoglobulins in serum and secretions: purification of rat IgM, IgA and IgG and their quantitation in serum, colostrum, milk and saliva. Immunochemistry 12, 817-823 (1975).

32. Shansab, M., Eccleston, J.M. & Selsing, E. Translocation of an antibody transgene requires AID and occurs by interchromosomal switching to all switch regions except the mu switch region. European journal of immunology 41, 1456-1464 (2011).

33. Bruggemann, M. et al. Human antibody production in transgenic mice: expression from 100 kb of the human IgH locus. European journal of immunology 21, 1323-1326 (1991).

34. Vincent-Fabert, C. et al. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. Blood 116, 1895-1898 (2010).

35. Davis, C.G., Gallo, M.L. & Corvalan, J.R. Transgenic mice as a source of fully human antibodies for the treatment of cancer. Cancer metastasis reviews 18, 421-425 (1999).

36. Lonberg, N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. Current opinion in immunology 20, 450-459 (2008).

37. Chen, K.C., A. New Insights into the Enigma of Immunoglobulin D. Immunol Rev 237, 160-179 (2010).

38. Popov, A.V., Zou, X., Xian, J., Nicholson, I.C. & Bruggemann, M. A human immunoglobulin lambda locus is similarly well expressed in mice and humans. The Journal of experimental medicine 189, 1611-1620 (1999).

39. Marchuk, D. & Collins, F.S. pYAC-RC, a yeast artificial chromosome vector for cloning DNA cut with infrequently cutting restriction endonucleases. Nucleic acids research 16, 7743 (1988).

40. Kaur, R., Ma, B. & Cormack, B.P. A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of Candida glabrata. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 7628-7633 (2007).

41. Nelson, D.L. & Brownstein, B.H. YAC libraries: A user's guide. Freeman and Company, NY (1994).
42. Gietz, D. & Woods, R.A. Transformation of yeast by the lithium acetate single-stranded carrier DNA/PEG method. Methods in Microbiology 26, 53-66 (1998).

43. Peterson, K.R. Preparation of intact yeast artificial chromosome DNA for transgenesis of mice. Nature protocols 2, 3009-3015 (2007).

44. Beverly, S.M. Characterization of the 'unusual' mobility of large circular DNAs in pulsed field-gradient electrophoresis Nucleic acids research 16, 925-939 (1988).

45. Kawasaki, K. et al. Evolutionary dynamics of the human immunoglobulin kappa locus and the germLine repertoire of the Vkappa genes. European journal of immunology 31, 1017-1028 (2001).

46. Sambrook, J. & Russell, D.W. Molecular Cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (2001).

47. Gu, H., Wilson, D. & Inselburg, J. Recovery of DNA from agarose gels using a modified Elutrap. Journal of biochemical and biophysical methods 24, 45-50 (1992).

48. Yang, X.W., Model, P. & Heintz, N. Homologous recombination based modification in Escherichia coli and germLine transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. Nature biotechnology 15, 859-865 (1997).

49. Meisner, L.M., and J. Johnson Protocols for cytogenetic studies of human embryonic stem cells. Methods 45, 133-141 (2008).

50. Kishiro, Y., Kagawa, M., Naito, I. & Sado, Y. A novel method of preparing rat-monoclonal antibody-producing hybridomas by using rat medial iliac lymph node cells. Cell structure and function 20, 151-156 (1995).

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido quimérico que comprende, en orden 5' a 3', un gen de región variable (V) de inmunoglobulina (Ig) humana, un gen de región de diversidad (D) de Ig humana, al menos un gen de región de unión (J) de inmunoglobulina (Ig) humana, un gen de región constante (C) de Ig y un potenciador 3' de rata que comprende la secuencia establecida como la SEQ ID NO: 1.

2. El polinucleótido quimérico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el gen de la región constante se selecciona del grupo que consiste en un gen de región constante humana y un gen de región constante de rata.

3. El polinucleótido quimérico de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el gen de la región constante (C) de Ig comprende un gen de la región constante (C) de rata.

4. El polinucleótido quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el gen de la región constante de Ig comprende un gen de la región constante (C) de Ig seleccionado del grupo que consiste en Cμ y Cγ.

5. El polinucleótido quimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 10, o una porción de la misma.

6. El polinucleótido quimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha región V de Ig humana comprende al menos un gen de región V humana aislable de BAC6-V_H3-11 (BAC6 (SEQ ID NO. 8) extendido por VH3-11 para proporcionar una superposición de 10.6 kb con BAC3 (SEQ ID NO. 9)) y/o SEQ ID NO. 9.

7. El polinucleótido quimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende secuencias de ácido nucleico (a) y (b) en el orden 5' a 3':

a) una región V de Ig humana que comprende genes de la región V de Ig humana en configuración natural aislable de BAC6-V_H3-11 (BAC6 (SEQ ID NO. 8) extendido por VH3-11 para proporcionar una superposición de 10.6 kb con BAC3 (SEQ ID NO 9)) y/o la SEQ ID NO. 9; y
b) una región J de Ig humana que comprende genes de la región J de Ig humana en configuración natural aislable de un cromosoma artificial bacteriano (BAC) que tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO. 10.

8. El polinucleótido quimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que cada una de la región variable de inmunoglobulina humana, la región de diversidad de inmunoglobulina humana, la región de unión de inmunoglobulina humana, la región constante de inmunoglobulina y el potenciador 3' de rata están en las posiciones relativas mostradas en la Figura 1a.

9. El polinucleótido quimérico de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico establecida como la SEQ ID NO: 2.

10. El polinucleótido quimérico de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico establecida como la SEQ ID NO: 11.

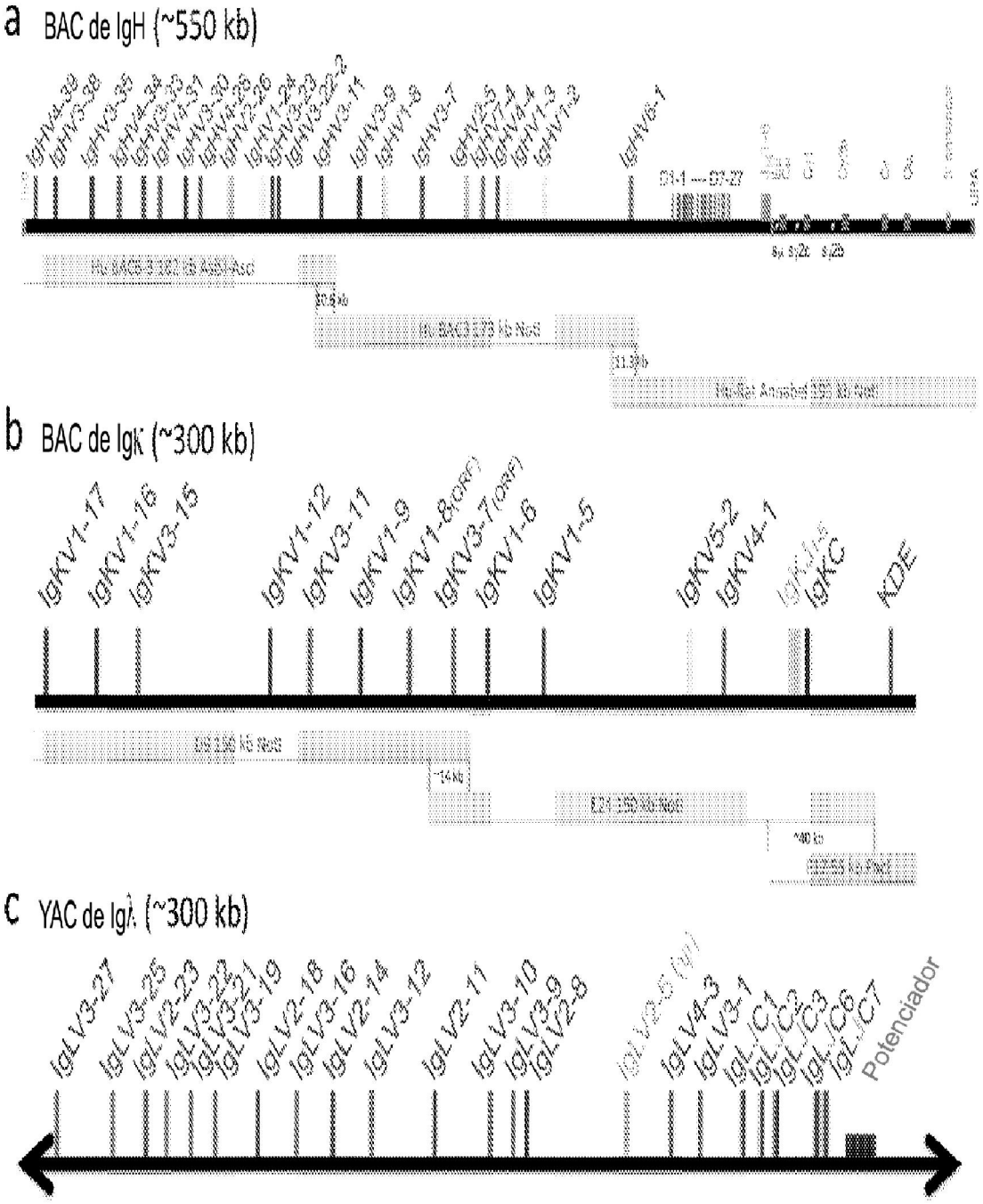
11. El polinucleótido quimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dichas regiones V-D-J de Ig son funcionales y capaces de reorganización génica.

12. El polinucleótido quimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dichas regiones V-D-J se reorganizan y forman un exón completo que codifica un dominio variable de cadena pesada.

13. Una célula de roedor aislada que comprende a) el polinucleótido quimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o b) el polinucleótido quimérico de acuerdo con la reivindicación 12.

14. La célula de roedor aislada de acuerdo con la reivindicación 13 (a), que comprende un polinucleótido que codifica una inmunoglobulina funcional que comprende genes de la región V, J y (C) de Ig y una secuencia de ácido nucleico sustancialmente homóloga a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7.

Fig. 1


a BAC de IgH (~550 kb)
b BAC de Igκ (~300 kb)
IgκV1-17
IgκV1-16
IgκV3-15
IgκV1-12
IgκV3-11
IgκV1-9
IgκV1-8(ORF)
IgκV3-7(ORF)
IgκV1-6
IgκV1-5
IgκV5-2
IgκV4-1
IgκC
KDE
c YAC de Igλ (~300 kb)
IgλV3-27
IgλV3-25
IgλV2-23
IgλV3-22
IgλV3-21
IgλV3-19
IgλV2-18
IgλV3-16
IgλV2-14
IgλV3-12
IgλV2-11
IgλV3-10
IgλV3-9
IgλV2-8
IgλV4-3
IgλV3-1
IgλC1
IgλC2
IgλC3
IgλC6
IgλC7
Potenciador

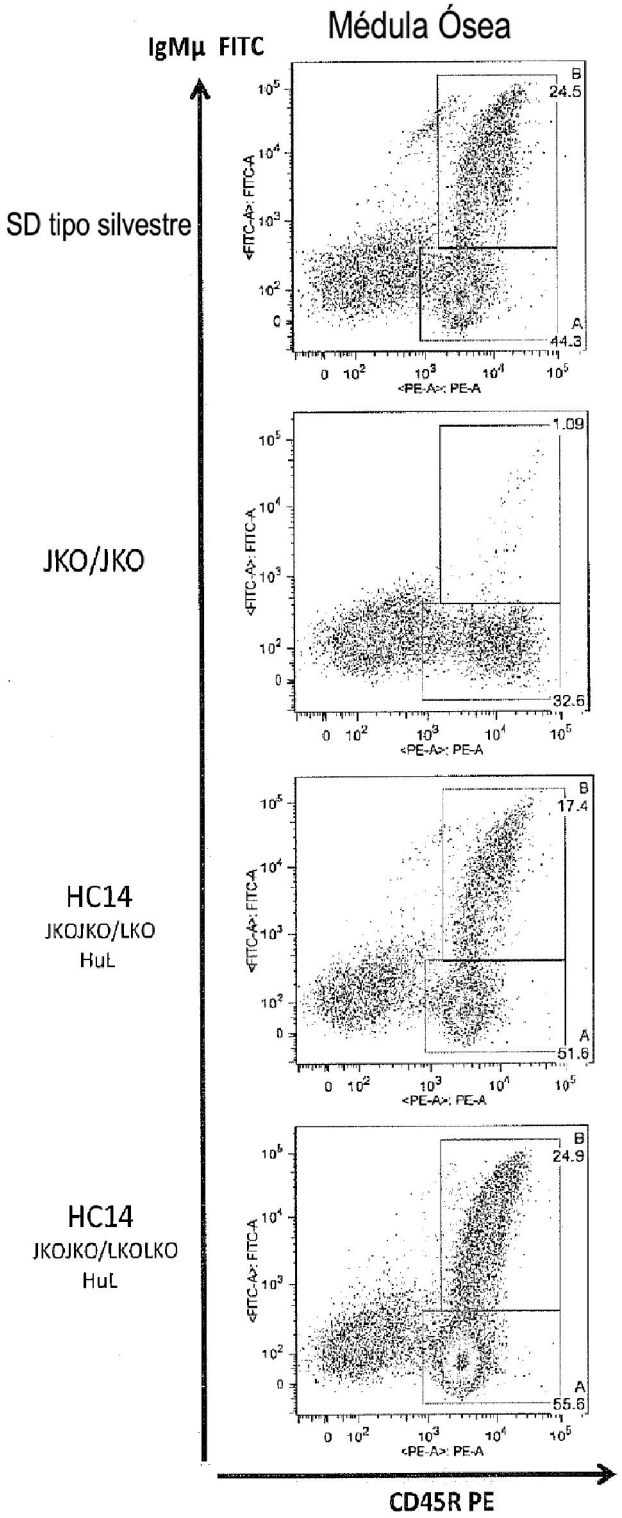

Médula Ósea
IgMμ FITC
SD tipo silvestre
JKO/JKO
HC14
JKOJKO/LKO
HuL
HC14
JKOJKO/LKOLKO
HuL
CD45R PE
24.5
44.3
1.09
32.6
17.4
51.6
24.9
55.6

Fig. 2a

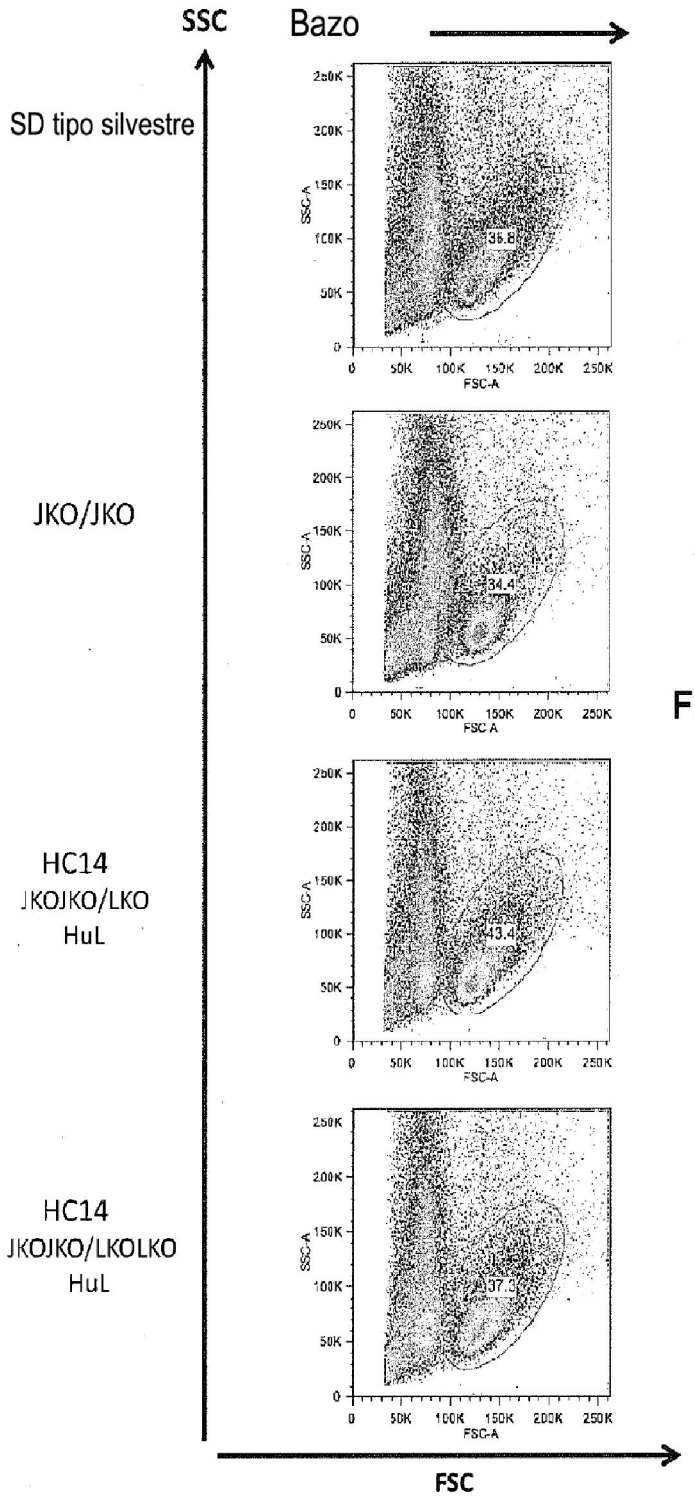

SSC
Bazo
SD tipo silvestre
JKO/JKO
HC14
JKOJKO/LKO
HuL
HC14
JKOJKO/LKOLKO
HuL
SSC-A
FSC-A
FSC

Fig. 2b

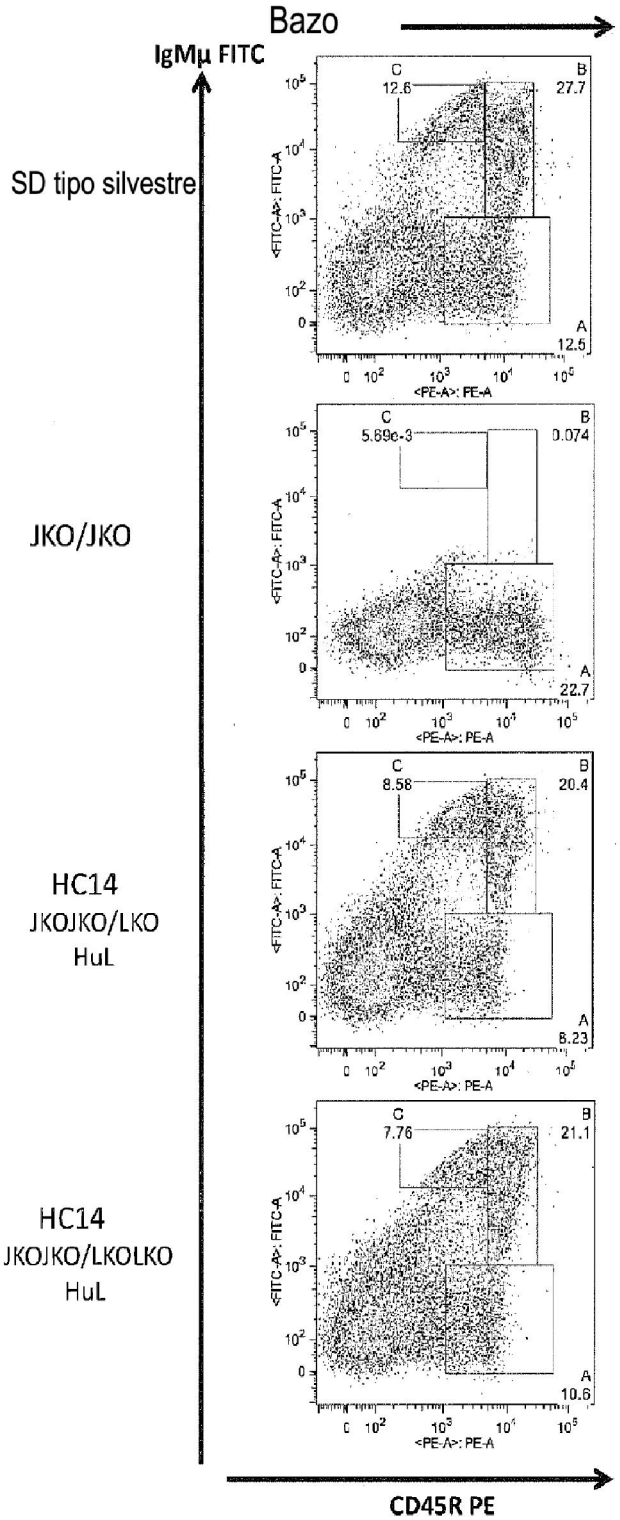

Bazo
IgMμ FITC
SD tipo silvestre
JKO/JKO
HC14
JKOJKO/LKO
HuL
HC14
JKOJKO/LKOLKO
HuL
C
12.6
B
27.7
A
12.5
C
5.89e-3
B
0.074
A
22.7
C
8.58
B
20.4
A
8.23
C
7.76
B
21.1
A
10.6
<FITC-A>: FITC-A
<PE-A>: PE-A
CD45R PE

Fig. 2c

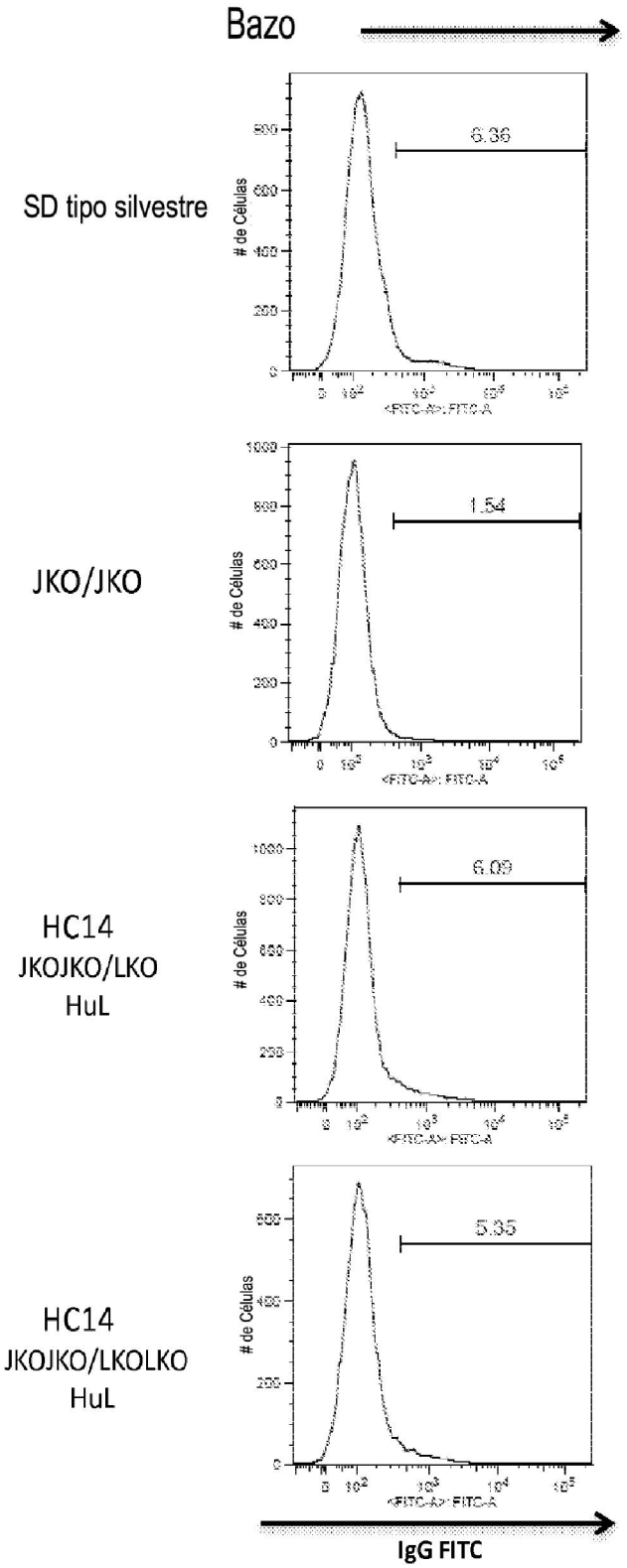

Bazo
SD tipo silvestre
6.36
de Células
JKO/JKO
1.54
de Células
HC14
JKOJKO/LKO
HuL
6.09
de Células
HC14
JKOJKO/LKOLKO
HuL
5.35
de Células
IgG FITC

Fig. 2d

Fig. 3

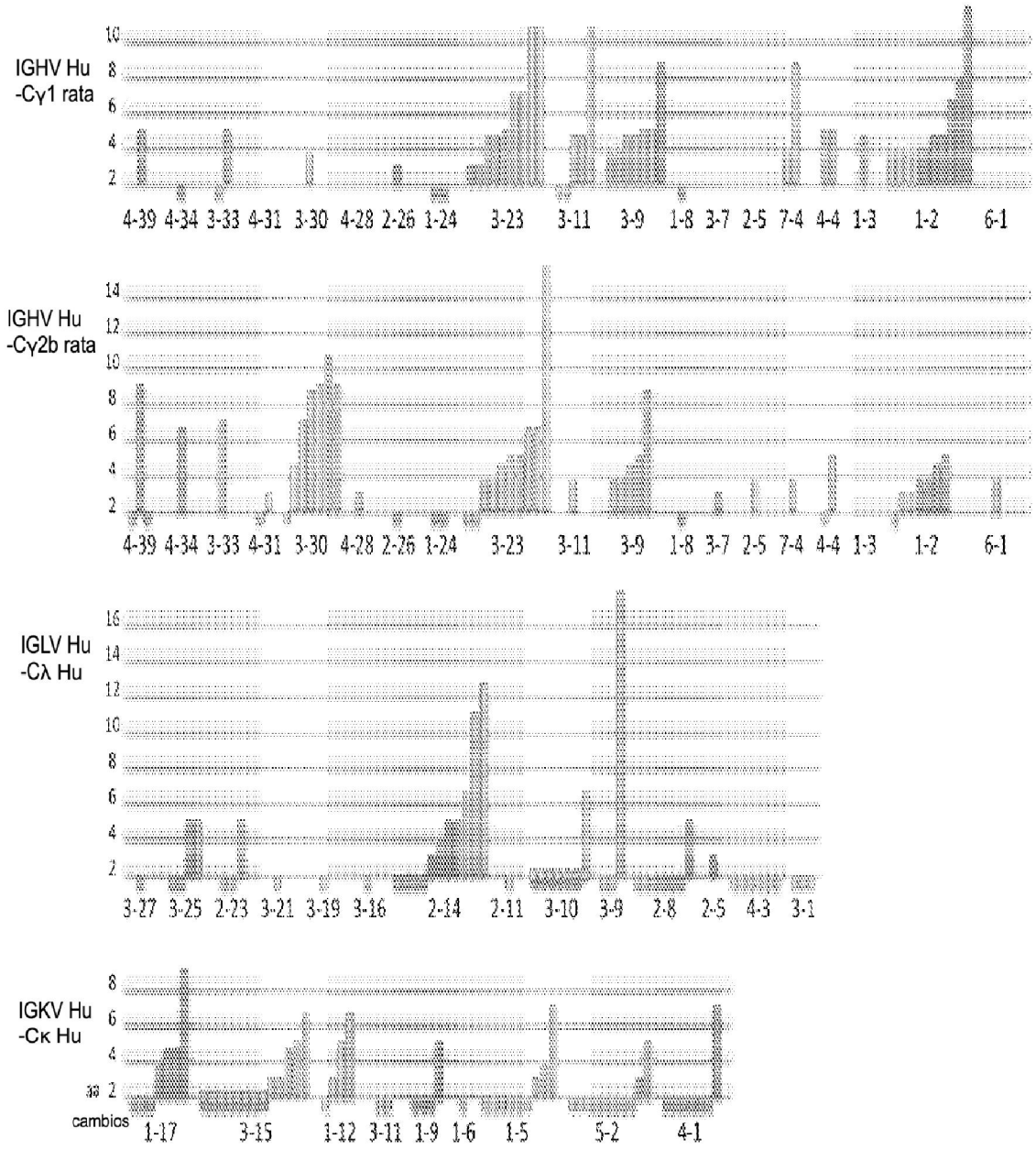
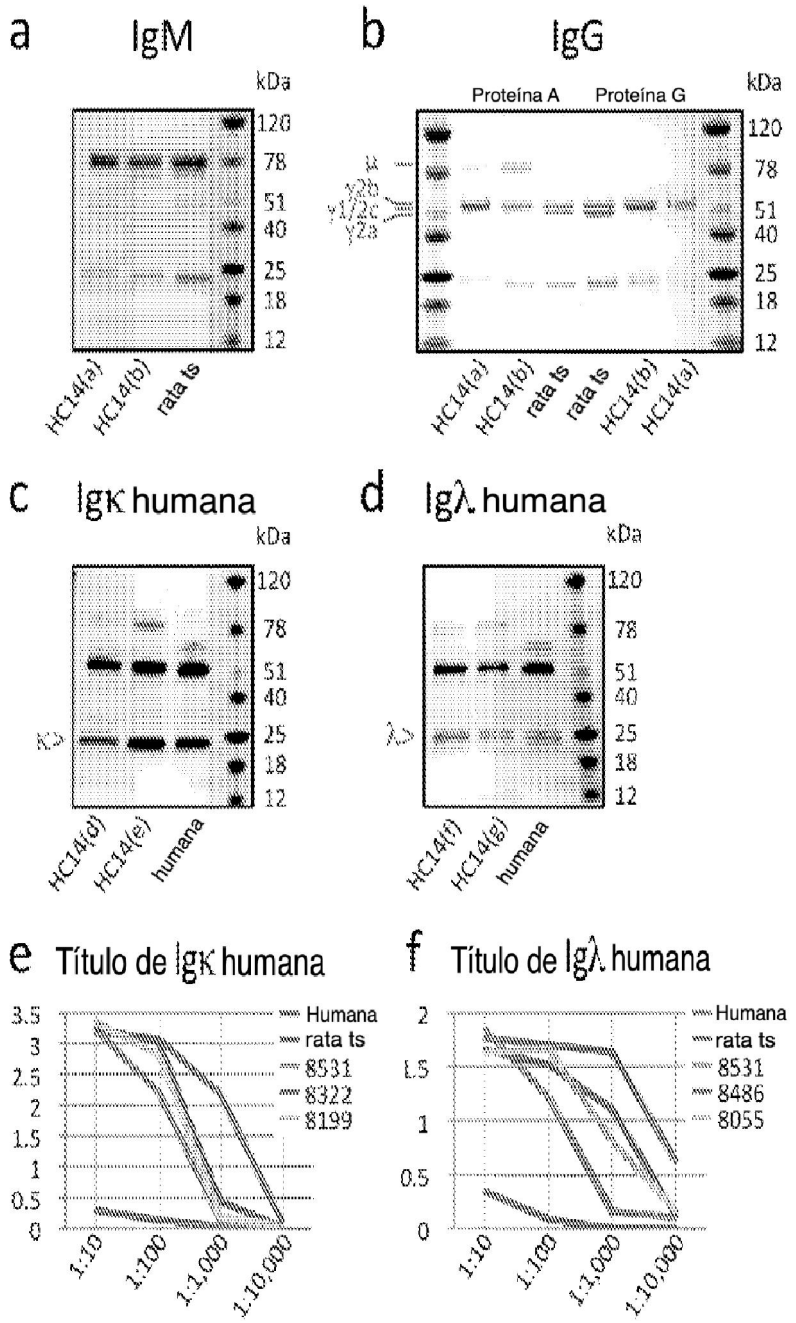

IGHV Hu
-Cγ1 rata
10
8
6
4
2
4-39 4-34 3-33 4-31 3-30 4-28 2-26 1-24 3-23 3-11 3-9 1-8 3-7 2-5 7-4 4-4 1-3 1-2 6-1
IGHV Hu
-Cγ2b rata
14
12
10
8
6
4
2
4-39 4-34 3-33 4-31 3-30 4-28 2-26 1-24 3-23 3-11 3-9 1-8 3-7 2-5 7-4 4-4 1-3 1-2 6-1
IGLV Hu
-Cλ Hu
16
14
12
10
8
6
4
2
3-27 3-25 2-23 3-21 3-19 3-16 2-14 2-11 3-10 3-9 2-8 2-5 4-3 3-1
IGKV Hu
-Cκ Hu
8
6
4
2
cambios
1-17 3-15 1-12 3-11 1-9 1-6 1-5 5-2 4-1

Fig. 4


a
IgM
kDa
120
78
51
40
25
18
12
HC14(a)
HC14(b)
rata ts
b
IgG
Proteína A
Proteína G
kDa
μ
γ2b
γ1/2c
γ2a
HC14(a)
HC14(b)
rata ts
rata ts
HC14(b)
HC14(a)
c
Igκ humana
κ
HC14(d)
HC14(e)
humana
d
Igλ humana
λ
HC14(f)
HC14(g)
humana
e
Título de Igκ humana
Humana
rata ts
8531
8322
8199
1:10
1:100
1:1,000
1:10,000
f
Título de Igλ humana
Humana
rata ts
8531
8486
8055
1:10
1:100
1:1,000
1:10,000