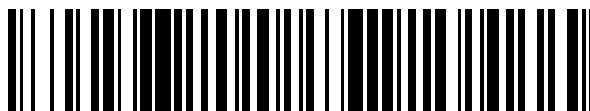


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 368**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2012 E 12795905 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 2663575**

54 Título: **IL-6 y receptor de IL-6 humanizados**

30 Prioridad:

28.10.2011 US 201161552900 P

07.11.2011 US 201161556579 P

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

23.12.2014

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

(100.0%)

777 Old Saw Mill River Road

Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

WANG, LI-HSIEN;

DORE, ANTHONY T.;

STEVENS, SEAN y

MURPHY, ANDREW J.

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 525 368 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

IL-6 y receptor de IL-6 humanizados

5 Campo de la invención

Se proporcionan animales no humanos que tienen un reemplazo de los genes de IL-6 y/o receptor de IL-6 animales no humanos endógenos. Se reemplazan los genes de IL-6 y/o receptor de IL-6 del animal no humano, en los loci no humanos endógenos, con genes de IL-6 humano y/o de receptor de IL-6 humanizado que comprenden una secuencia humana. Los animales no humanos que tienen genes de IL-6 humano y/o de receptor de IL-6 humanizado, en los que los animales no humanos no presentan una o más patologías que son características de animales no humanos transgénicos para IL-6 humana.

15 Antecedentes

Se conocen en la técnica ratones transgénicos para un gen de IL-6 humano. Sin embargo, la inserción al azar de un transgén de IL-6 humano en el genoma del ratón da como resultado una expresión escasamente regulada de la proteína IL-6 humana, que se manifiesta por sí misma en una variedad de patologías en tales ratones transgénicos, incluyendo, pero sin limitarse a, plasmocitosis y glomerulonefritis. Como resultado, estos ratones tienen una utilidad limitada.

Existe la necesidad de animales no humanos, por ejemplo, ratones y ratas, que expresen IL-6 humana o humanizada y/o receptor de IL-6 humano o humanizado. Existe la necesidad de tales ratones humanizados que no presenten una o más patologías presentadas por ratones hIL-6 transgénicos.

25 Sumario

En un aspecto, la invención proporciona un ratón modificado genéticamente tal como se define en las reivindicaciones.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para preparar un ratón humanizado, siendo dicho método tal como se define en las reivindicaciones.

Se describen en el presente documento animales murinos modificados genéticamente que expresan un gen de receptor de IL-6 humano (o un gen que codifica para un ectodominio humano y dominios transmembrana e intracelulares de ratón) bajo el control del promotor murino endógeno y/o elementos reguladores murinos endógenos, a partir de un locus de receptor de IL-6 murino endógeno.

También se describe en el presente documento que se proporciona un animal modificado genéticamente (por ejemplo, un animal murino, por ejemplo, un ratón o una rata) que expresa una proteína IL-6 humana, en el que el animal no humano no presenta una patología seleccionada de plasmocitosis, glomerulonefritis, glomeruloesclerosis, glomerulonefritis mesangio-proliferativa, linfoma intestinal, linfoma renal, esplenomegalia, agrandamiento de ganglios linfáticos, agrandamiento del hígado, megacariocitos en la médula ósea, células plasmáticas anómalas compactadas, infiltración de células plasmáticas en el pulmón o el hígado o el riñón, proliferación de células mesangiales en el riñón, sobreexpresión cerebral de IL-6, células microgliales ramificadas en la materia blanca, astrocitosis reactiva en el cerebro, insuficiencia renal, megacariocitos elevados en el bazo, atrofia muscular progresiva (por ejemplo, atrofia muscular progresiva de los gemelos), catepsinas musculares B y B+L elevadas (por ejemplo, alrededor de 20 veces y 6 veces), y una combinación de los mismos.

Se describe en el presente documento un animal no humano que comprende una población de células B normales, población de células B normales que puede ser aproximadamente la misma en número e inmunofenotipo que un animal de tipo natural, por ejemplo, un ratón de tipo natural.

El animal no humano descrito en el presente documento puede ser murino (por ejemplo, un ratón o una rata) y puede expresar IL-6 humana (hIL-6) en suero a un nivel por debajo de aproximadamente 800 pg/ml, por debajo de aproximadamente 700, 600, 500, 400, 300 ó 200 pg/ml. En una realización específica, el animal murino expresa hIL-6 en suero a un nivel de aproximadamente 50 a aproximadamente no más de 200 pg/ml, en otra realización aproximadamente 75-125 pg/ml, en otra realización a aproximadamente 100 pg/ml.

También se describen en el presente documento animales no humanos que expresan hIL-6 y/o hIL-6R, en los que los animales no humanos expresan hIL-6 y/o hIL-6R a partir de un locus de IL-6 no humano endógeno y/o un locus de hIL-6R no humano endógeno. El animal no humano es murino (por ejemplo, ratón o rata).

También se describe en el presente documento un ratón modificado genéticamente que expresa hIL-6 a partir de un locus de IL-6 de ratón endógeno, en el que el gen de IL-6 de ratón endógeno se ha reemplazado con un gen de hIL-6.

También se describe en el presente documento un ratón que comprende una célula que expresa un receptor de IL-6 (IL-6R) que comprende un ectodominio humano sobre la superficie de la célula. La célula puede ser un linfocito, por ejemplo una célula B.

5 Tal como se describe en el presente documento, pueden delecionarse aproximadamente 6,8 kb en el locus de IL-6 de ratón endógeno, incluyendo los exones 1 a 5 y una secuencia no traducida en 3', y reemplazarse con aproximadamente 4,8 kb de secuencia génica de IL-6 humana que comprende los exones 1 a 5 del gen de IL-6 humano. Un gen de IL-6 humano descrito en el presente documento comprende los exones 1 a 5 del gen de IL-6 humano de BAC CTD-2369M23 humano.

También se describe en el presente documento un ratón modificado genéticamente que expresa IL-6 a partir de un gen de IL-6 humano, en el que el ratón expresa IL-6 humana en su suero.

15 Se describe en el presente documento suero de ratón que presenta una concentración en suero de IL-6 humana de aproximadamente 25 a aproximadamente 300 pg/ml, de 50 a aproximadamente 250 pg/ml, de 75 a aproximadamente 200 pg/ml o de 100 a aproximadamente 150 pg/ml. También se describen niveles de IL-6 humana en el suero del ratón de aproximadamente 100 pg/ml.

20 También se describen en el presente documento niveles de un marcador panespecífico de células B en médula ósea del ratón a aproximadamente el mismo que el de un ratón de tipo natural. El nivel de un marcador panespecífico de células B en bazo puede ser aproximadamente el mismo que el de un ratón de tipo natural. Los marcadores panespecíficos de células B descritos en el presente documento incluyen los seleccionados de B220, CD19, CD20, CD22, CD79a, CD79b, L26 y Pax-5 (BSAP).

25 Se describe en el presente documento un ratón modificado genéticamente que expresa hIL-6, en el que el ratón no presenta una característica seleccionada de plasmocitosis, esplenomegalia, agrandamiento de ganglios linfáticos, células plasmáticas anómalas compactadas, y una combinación de los mismos.

30 El ratón descrito en el presente documento puede comprender un bazo que tiene aproximadamente el mismo peso (por peso corporal) que un ratón de tipo natural. Los ganglios linfáticos de este ratón pueden tener aproximadamente el mismo peso (por peso corporal) que un ratón de tipo natural. Las células plasmáticas de este ratón pueden no presentar plasmocitosis característica de ratones que sobreexpresan IL-6 humana.

35 El ratón descrito en el presente documento puede no presentar glomerulonefritis.

El ratón descrito en el presente documento puede no presentar un nivel de células mesangiales comparable a un ratón de tipo natural.

40 También se describe en el presente documento un ratón modificado genéticamente que expresa hIL-6 a partir de un locus de IL-6 de ratón endógeno, en el que el gen de IL-6 de ratón endógeno se ha reemplazado con un gen de hIL-6, en el que el ratón no presenta una característica seleccionada de una neuropatología detectable morfológicamente, una astrocitosis reactiva, y una combinación de las mismas. El ratón tal como se describe en el presente documento puede comprender un cerebro que es morfológicamente no distinto de un cerebro de ratón de tipo natural. El ratón tal como se describe en el presente documento puede comprender tejido cerebral que presenta un nivel de astrocitosis reactiva que no es superior al de un ratón de tipo natural.

50 Se describe en el presente documento un ratón que no expresa IL-6 humana en neuronas. Dicho ratón puede comprender niveles de astrocitos activados que son comparables con niveles de astrocitos activados en un ratón de tipo natural.

55 Se describe en el presente documento un ratón que comprende células microgliales ramificadas en su materia blanca, en el que las células microgliales ramificadas están presentes en una cantidad equivalente a una cantidad de células microgliales ramificadas en un ratón de tipo natural.

60 Se describe en el presente documento un ratón que no presenta una astrocitosis reactiva. La materia blanca de dicho ratón puede ser morfológicamente no distinta de la materia blanca de un ratón de tipo natural. La materia blanca de dicho ratón puede ser histológicamente no distinta de la materia blanca de un ratón de tipo natural con respecto a la tinción histoquímica de astrocitos reactivos.

65 Se describe en el presente documento un ratón que comprende un cerebro que es morfológicamente no distinto del cerebro de un ratón de tipo natural. El ratón descrito puede comprender tejido cerebral que presenta un nivel de astrocitosis reactiva que no es superior al de un ratón de tipo natural.

Se describe en el presente documento un ratón modificado genéticamente que expresa hIL-6 a partir de un locus de IL-6 de ratón endógeno, en el que el gen de IL-6 de ratón endógeno se ha reemplazado con un gen de hIL-6, en el

que el ratón no presenta una característica seleccionada de una vida acortada en aproximadamente el 50% o más, insuficiencia renal, hipergammaglobulinemia, megacariocitos elevados en el bazo, megacariocitos elevados en la médula ósea, plasmocitosis de bazo, plasmocitosis de timo, plasmocitosis de ganglios linfáticos, glomerulonefritis, glomeruloesclerosis, y una combinación de los mismos.

5 Los ratones descritos en el presente documento pueden tener una vida que supera las 20 semanas. En una realización, los ratones tienen una vida que supera las 30 semanas, 40 semanas o 50 semanas. Los ratones descritos en el presente documento pueden presentar una vida aproximadamente igual a la de un ratón de tipo natural de la misma variedad.

10 Se describen en el presente documento ratones que presentan un nivel de megacariocitos en el bazo que no es mayor que aproximadamente el nivel de megacariocitos esplénicos de un ratón de tipo natural

15 Se describen en el presente documento ratones que comprenden órganos linfoides que están desprovistos esencialmente de células plasmocitoides anómalas y dispuestas de manera compacta.

20 Se describen en el presente documento ratones que presentan niveles en suero de gammaglobulina equivalentes a niveles en suero de gammaglobulina en ratones de tipo natural. Los niveles de α 1- y β -globulina en suero de los ratones descritos en el presente documento pueden ser equivalentes a los niveles en suero de α 1- y β -globulina de ratones de tipo natural de la misma variedad.

25 Se describe en el presente documento un ratón modificado genéticamente que expresa IL-6 humana a partir de un locus de IL-6 de ratón endógeno, en el que el gen de IL-6 de ratón endógeno se ha reemplazado con un gen de hIL-6, en el que el ratón no presenta una característica seleccionada de atrofia muscular progresiva, un nivel de catepsina B elevado en comparación con un ratón de tipo natural de la misma variedad, un nivel de catepsina A+B elevado en comparación con un ratón de tipo natural de la misma variedad, un aumento del peso del hígado en comparación con un ratón de tipo natural de la misma variedad, y una combinación de los mismos.

30 Tal como se describe en el presente documento, el peso del hígado del ratón puede ser de aproximadamente 800-900 mg a las 12 semanas.

35 Se describe en el presente documento un ratón que presenta un nivel de catepsina B a lo largo de toda su vida que no es mayor que aproximadamente el nivel observado en un ratón de tipo natural. Tal como se describe en el presente documento, el ratón presenta un nivel de catepsina A+B a lo largo de toda su vida que no es mayor que aproximadamente el nivel observado en un ratón de tipo natural.

40 Se describe en el presente documento un ratón que como adulto presenta un peso de los músculos gemelos que está dentro de aproximadamente el 10% del peso de un ratón de tipo natural de la misma variedad. Dicho ratón como adulto puede presentar un peso de los músculos gemelos que es aproximadamente el mismo que el de un ratón de tipo natural.

45 Se describe en el presente documento un ratón que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína IL-6 humana, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína IL-6 humana reemplaza en su totalidad o en parte una secuencia de nucleótidos endógena que codifica para una proteína IL-6 de ratón endógena.

50 Se describe en el presente documento un ratón que comprende un reemplazo en un locus de receptor de IL-6 de ratón endógeno de ectodominio de IL-6R α de ratón con una secuencia de ectodominio de un IL-6R α humano para formar un gen de IL-6R α de ser humano/ratón quimérico.

Se describe en el presente documento un gen de IL-6R α quimérico que está bajo el control de un promotor de ratón y/o elementos reguladores de ratón en el locus de IL-6R α de ratón endógeno.

55 Se describe en el presente documento el reemplazo de aproximadamente 35,4 kb de una secuencia que codifica para ectodominio de IL-6R α de ratón con aproximadamente 45,5 kb de una secuencia que codifica para ectodominio de IL-6R humano.

60 Se describe en el presente documento una secuencia que codifica para ectodominio de IL-6R humano que abarca el primer codón (ATG) en del exón 1 al exón 8.

Se describe en el presente documento una secuencia de IL-6R α de ratón colocada que incluye una secuencia contigua que abarca los exones 1 a 8. En una realización específica, se delecionan los exones 1 a 8 y una parte del intrón 8.

65 Se describe en el presente documento un ratón modificado genéticamente que comprende un reemplazo en un

locus de IL-6 de ratón endógeno de un gen de ratón que codifica para IL-6 con un gen humano que codifica para IL-6 humana, en el que el gen humano que codifica para IL-6 humana está bajo el control de elementos reguladores de ratón endógenos en el locus de IL-6 de ratón endógeno.

5 Se describe en el presente documento un gen humano que codifica para IL-6 humana que es un gen de IL-6 humano de BAC ID CTD-2369M23.

10 Se describe en el presente documento un ratón que expresa un IL-6R α de ratón. Este ratón puede expresar un IL-6R α humano. Se describe en el presente documento un IL-6R α humanizado que comprende un ectodominio humano. También se describe un IL-6R α humanizado que comprende un dominio transmembrana de ratón y un dominio citoplasmático de ratón. También se describe un ratón que expresa un IL-6R α humanizado que comprende una humanización de ectodominio pero no dominio transmembrana y/o citosólico.

15 Se describe en el presente documento un ratón que no presenta una característica seleccionada de plasmocitosis, glomeruloesclerosis, glomerulonefritis, insuficiencia renal, hipergammaglobulinemia, megacariocitos elevados en el bazo, megacariocitos elevados en la médula ósea, esplenomegalia, agrandamiento de ganglios linfáticos, células plasmáticas anómalas compactadas, y una combinación de los mismos.

20 Se describe en el presente documento un ratón modificado genéticamente que comprende una humanización de un gen de IL-6R α de ratón endógeno, en el que la humanización comprende un reemplazo de una secuencia que codifica para ectodominio de IL-6R α de ratón con una secuencia que codifica para ectodominio de IL-6R α humano en el locus de IL-6R α de ratón endógeno.

25 Se describe en el presente documento una secuencia de ratón contigua que comprende los exones de ratón 1 a 8 que se reemplaza con un fragmento genómico contiguo de una secuencia de IL-6R α humana que codifica para un ectodominio de IL-6R α humano. Se describe en el presente documento un fragmento genómico contiguo de una secuencia de IL-6R α humana que codifica para el ectodominio de BAC CTD-2192J23.

30 Se describe en el presente documento un ratón que comprende además un gen de IL-6 humanizado. Se describe en el presente documento un ratón que comprende un reemplazo en un locus de IL-6 de ratón endógeno de un gen de IL-6 de ratón con un gen de IL-6 humano. También se describe un gen de IL-6 humanizado bajo el control de elementos reguladores de ratón endógenos.

35 Se describe en el presente documento un método para preparar un ratón humanizado, que comprende reemplazar una secuencia génica de ratón que codifica para IL-6 de ratón con un gen humano que codifica para IL-6 humana.

40 Tal como se describe en el presente documento, el reemplazo puede ser en un locus de IL-6 de ratón endógeno, y el gen humano que codifica para IL-6 humana puede estar unido operativamente a secuencias reguladoras de ratón endógenas.

45 Se describe en el presente documento un método para preparar un ratón humanizado que comprende reemplazar exones de ratón que codifican para secuencias de ectodominio de IL-6R α de ratón con un fragmento genómico humano que codifica para secuencias de ectodominio de IL-6R α humano para formar un gen de IL-6R α humanizado.

50 Tal como se describe en el presente documento, el reemplazo puede ser en un locus de IL-6R α de ratón endógeno, y el gen de IL-6R α humanizado puede estar unido operativamente a secuencias reguladoras de ratón endógenas.

55 Se describe en el presente documento un ratón modificado genéticamente, que comprende un gen de IL-6R α humanizado que comprende un reemplazo de una secuencia que codifica para ectodominio de ratón con una secuencia de ectodominio humano, en el que el gen de IL-6R α humanizado comprende una secuencia transmembrana de ratón y una secuencia citoplasmática de ratón; en el que el ratón comprende además un gen que codifica para una IL-6 humana, en el que el gen que codifica para una IL-6 humana está bajo el control de elementos reguladores de IL-6 de ratón endógenos.

60 Tal como se describe en el presente documento, el ratón puede ser incapaz de expresar un IL-6R α completamente de ratón e incapaz de expresar una IL-6 de ratón.

65 Se describen en el presente documento ratones modificados genéticamente que comprenden modificaciones genéticas en su línea germinal.

Tal como se describe en el presente documento, se proporciona un tejido, una célula o un fragmento de membrana de un ratón.

Se describe en el presente documento un tejido o una célula de un ratón que expresa una proteína IL-6 humana,

5 pero que no expresa una proteína IL-6 de ratón. En una realización, el tejido o la célula es de un ratón que expresa una proteína IL-6R α humanizada, pero no una proteína IL-6R α de ratón. En una realización, la proteína IL-6R α humanizada comprende un ectodominio humano y un dominio transmembrana de ratón y un dominio citosólico de ratón. En una realización, el tejido o la célula es de un ratón que expresa una IL-6 humana, un IL-6R α humanizado y que no expresa una IL-6 de ratón y no expresa un IL-6R α que comprende un ectodominio de ratón.

También se describe en el presente documento un complejo *ex vivo* de una célula de ratón que porta un IL-6R α humanizado (ectodominio humano y dominio transmembrana de ratón y citoplasmático de ratón) y una IL-6 humana.

10 También se describe en el presente documento un embrión de ratón que comprende una modificación genética tal como se describe en el presente documento.

Se describe en el presente documento un embrión huésped de ratón que comprende una célula donadora que comprende una modificación genética tal como se describe en el presente documento.

15 Se describe en el presente documento una célula de animal no humano pluripotente o totipotente que comprende una modificación genética tal como se describe en el presente documento, en la que la célula puede ser una célula murina o una célula ES.

20 Se describe en el presente documento un óvulo de ratón, en el que el óvulo de ratón comprende un cromosoma de ratón ectópico, en el que el cromosoma de ratón ectópico comprende una modificación genética tal como se describe en el presente documento.

25 Se describe en el presente documento un ratón, un embrión, un óvulo o una célula que está modificado genéticamente para comprender un gen de IL-6 humano o gen de IL-6R α humano o humanizado que es de un ratón que es de una variedad C57BL seleccionada de C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr y C57BL/Ola. Se describe en el presente documento un ratón que es una variedad 129 seleccionada del grupo que consiste en una variedad que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 30 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (véase, por ejemplo, Festing *et al.* (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836, véase también, Auerbach *et al.* (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines). Se describe en el presente documento un ratón modificado genéticamente que es una mezcla de una variedad 129 mencionada anteriormente y una variedad C57BL/6 mencionada anteriormente. También se describe en el presente documento un ratón que es una mezcla de las variedades 129 mencionadas anteriormente, o una mezcla de las variedades BL/6 mencionadas anteriormente. También se describe en el presente documento un ratón en el que la variedad 129 de la mezcla es una variedad 129S6 (129/SvEvTac). También se describe en el presente documento un ratón que es una variedad BALB, por ejemplo, una variedad BALB/c. También se describe en el presente documento un ratón que es una mezcla de una variedad BALB y otra variedad mencionada anteriormente. Se describe en el presente 40 documento un ratón que es un ratón Swiss o Swiss Webster.

Cada uno de los aspectos y las realizaciones descritos en el presente documento pueden usarse juntos, a menos que se excluya o bien explícitamente o bien claramente del contexto de la realización o el aspecto.

45 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 proporciona una ilustración, no a escala, de los loci genómicos de IL-6 humana (parte superior) y de ratón (parte inferior). Los exones I, II, III, IV y V (tanto en ser humano como en ratón) se indican mediante recuadros cerrados a la derecha de la figura. Se indican supuestas regiones reguladoras seleccionadas mediante recuadros 50 abiertos a la izquierda de la figura.

La figura 2 muestra la respuesta de fase aguda (nivel de mSAA) en presencia o ausencia de trementina en ratones de tipo natural, ratones con IL-6R de ectodominio humanizado y ratones con genes de IL-6 e IL-6R humanizados.

55 La figura 3 muestra la respuesta de fase aguda dependiente de trementina (SAA) en ratones de tipo natural en ausencia o presencia de anticuerpo anti-IL-6R de ratón (izquierda); y la respuesta de fase aguda dependiente de trementina en ratones con IL-6/IL-6R humanizado en ausencia o presencia de anticuerpo anti-IL-6R humano (derecha).

60 La figura 4 muestra el análisis de FACS para células B esplénicas de ratones con IL-6 humanizada y de tipo natural; panmarcador de células B.

La figura 5 muestra el análisis de FACS para células T esplénicas de ratones con IL-6 humanizada y de tipo natural; células T auxiliares y células T citotóxicas.

65

La figura 6 muestra el análisis de FACS para células esplénicas de ratones con IL-6 humanizada y de tipo natural; Ly6G/C(Gr1).

5 La figura 7 muestra el análisis de FACS para células esplénicas de ratones con IL-6 humanizada y de tipo natural; células NK y granulocitos (Ly6G^{hi+}/CD11b^{hi+}).

La figura 8 muestra el análisis de FACS para células B sanguíneas de ratones con IL-6 humanizada y de tipo natural; panmarcador de células B.

10 La figura 9 muestra el análisis de FACS para células T sanguíneas de ratones con IL-6 humanizada y de tipo natural; células T auxiliares y células T citotóxicas.

La figura 10 muestra el análisis de FACS para células mieloides sanguíneas de ratones con IL-6 humanizada y de tipo natural; células Gr1⁺.

15 La figura 11 muestra el análisis de FACS para células mieloides sanguíneas de ratones con IL-6 humanizada y de tipo natural; CD11b frente a Ly6G/C(Gr1).

20 La figura 12 muestra el análisis de FACS para células mieloides sanguíneas de ratones con IL-6 humanizada y de tipo natural; células DX5 frente a CD11b.

La figura 13 muestra el análisis de FACS de IgM/CD24/B220 de médula ósea para ratones con IL-6 humanizada y de tipo natural. Parte superior: progresión normal en médula ósea. Parte inferior: análisis de FACS para tipo natural, heterocigotos para hIL-6 y homocigotos para hIL-6 (tinción de IgM).

25 La figura 14 muestra el análisis de FACS de IgM/CD24/B220 de médula ósea para ratones con IL-6 humanizada y de tipo natural. Parte superior: progresión normal en médula ósea. Parte inferior: análisis de FACS para tipo natural, heterocigotos para hIL-6 y homocigotos para hIL-6 (tinción de CD24).

30 La figura 15 muestra el análisis de FACS de CD43 y B220 de médula ósea para ratones con IL-6 humanizada y de tipo natural. Parte superior: progresión normal en médula ósea. Parte inferior: análisis de FACS para tipo natural, heterocigotos para hIL-6 y homocigotos para hIL-6 (tinción de CD43).

35 Descripción detallada

IL-6 e IL-6R

El receptor de IL-6 (IL-6R) se caracterizó hace tiempo como un receptor para un factor estimulador de células B (BSF-2 o factor estimulador de células B 2; también, BCDF o factor de diferenciación de células B) responsable de la inducción de células B para que sinteticen inmunoglobulina (Yamasaki *et al.* (1988) Cloning and Expression of the Human Interleukin-6(BSF-2/IFN β 2) Receptor, *Science* 241: 825-828). La IL-6 se describió por primera vez como interferón- β 2 como resultado de su descubrimiento durante una búsqueda de una proteína inducida por virus denominada interferón- β , tratando fibroblastos humanos con ARNbc poli(I)poli(C) para inducir una respuesta antiviral (Weissenbach *et al.* (1980) Two interferon mRNAs in human fibroblasts: *In vitro* translation and *Escherichia coli* cloning studies, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 77 (12): 7152-7156; Keller *et al.* (1996) Molecular and Cellular Biology of Interleukin-6 and Its Receptor, *Frontiers in Bioscience* 1: d340-357).

El ADNc humano codifica para una proteína de 468 aminoácidos que tiene una secuencia señal de 19 meros y un dominio citoplasmático de aproximadamente 82 aminoácidos que carece de un dominio tirosina cinasa (véase, ídem). El extremo N-terminal (ectodominio) de la proteína tiene un dominio de superfamilia de Ig de aproximadamente 90 aminoácidos, un dominio de 250 aminoácidos entre el dominio de superfamilia de Ig y la membrana, un dominio que abarca la membrana de aproximadamente 28 aminoácidos (véase, ídem). El ectodominio del receptor se une a su ligando IL-6, que desencadena la asociación con gp130 en la membrana y es este complejo el que realiza la transducción de señales; el dominio citoplasmático no transduce según se notifica ninguna señal (Taga *et al.* (1989) Interleukin-6 Triggers the Association of Its Receptor with a Possible Signal Transducer, gp130, *Cell* 58: 573-581). De hecho, una forma soluble de IL-6R que carece de un dominio citoplasmático puede asociarse con IL-6 y unirse a gp130 sobre la superficie de una célula y transducir de manera eficaz la señal (ídem).

60 La homología de hIL-6R y mLIL-6R al nivel de proteína es de sólo aproximadamente el 54%; el dominio transmembrana tiene una homología de aproximadamente el 79%, mientras que el dominio citoplasmático tiene una homología de aproximadamente el 54% (Sugito *et al.* (1990)).

65 El ligando natural para el IL-6R, IL-6, se aisló por primera vez de cultivos de células T transformadas con VLTH-1 (véase, Hirano *et al.* (1985) Purification to homogeneity and characterization of human B cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5490-5494). Se clonó un ADNc humano para el gen de IL-6 al

menos dos veces, una vez como BSF-2 (véase, Hirano *et al.* (1986) Complementary DNA from a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin, *Nature* 324: 73-76) y una vez como IFN β 2 (véase, Zilberstein *et al.* (1986) Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines, *EMBO* 5: 2529-2537), aunque se ha demostrado desde entonces que la IL-6 humana recombinante no presenta actividad de IFN detectable.

La IL-6 humana es una proteína de 184 aminoácidos que presenta una homología de sólo aproximadamente el 42% con IL-6 de ratón, aunque la organización genómica de los genes humano y de ratón es básicamente la misma, y las regiones promotoras de los genes humano y de ratón comparten un tramo de 400 pb que está altamente conservado (véase, Tanabe *et al.* (1988) Genomic Structure of the Murine IL-6 Gene: High Degree Conservation of Potential Regulatory Sequences between Mouse and Human, *J. Immunol.* 141 (11): 3875-3881).

El gen de IL-6 humano tiene aproximadamente 5 kb (Yasukawa *et al.* (1987) Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene, *EMBO J.* 6 (10): 2939-2945), mientras que el gen de IL-6 de ratón tiene aproximadamente 7 kb (Tanabe *et al.* (1988) Genomic Structure of the Murine IL-6 Gene: High Degree Conservation of Potential Regulatory Sequences between Mouse and Human, *J. Immunol.* 141 (11): 3875-3881). Los genes de IL-6 humano y de ratón comparten según se notifica una secuencia flanqueante en 5' altamente conservada importante para la regulación. Se muestra un diagrama esquemático de los loci genómicos de IL-6 humano y de ratón en la figura 1 (no a escala). Los exones I, II, III, IV y V (tanto en ser humano como en ratón) se indican mediante recuadros cerrados a la derecha de la figura. Se indican supuestas regiones reguladoras seleccionadas mediante recuadros abiertos a la izquierda de la figura. Las supuestas regiones reguladoras para seres humanos son, de izquierda a derecha, un elemento de glucocorticoide desde -557 hasta -552; una secuencia de núcleo potenciador de IFN desde -472 hasta -468; un elemento de glucocorticoide desde -466 hasta -461; una región rica en AT desde -395 hasta -334, un sitio de unión a AP-1 consenso desde -383 hasta -277; una secuencia de núcleo potenciador de IFN desde -253 hasta -248; un motivo que contiene GGAAA desde -205 hasta -192; una secuencia de homología a SRE de c-fos desde -169 hasta -82 que contiene una secuencia de núcleo potenciador de IFN, un elemento de respuesta a AMPc, un motivo de GGAAA, una caja CCAAT y una región rica en GC; y un sitio de unión a AP-1 desde -61 hasta -55; y una caja CCAAT desde -34 hasta -30. Las supuestas regiones reguladoras para ratón son, de izquierda a derecha, una región rica en GC desde -553 hasta -536, un elemento de glucocorticoide desde -521 hasta -516 y desde -500 hasta -495; un tramo de ADN-Z desde -447 hasta -396; un sitio de unión a AP-1 que se solapa con una secuencia de núcleo potenciador de IFN desde -277 hasta -288, un motivo GGAAA que se solapa con una secuencia de núcleo potenciador de IFN desde -210 hasta -195; una región de homología a SRE de c-fos desde -171 hasta -82 que contiene un elemento de respuesta a AMPc, un motivo GGAAA que se solapa con una secuencia de núcleo potenciador de IFN y una región rica en GC; y un sitio de unión a AP-1 desde -61 hasta -55. Los codones de ratón I-V tienen longitudes de 19, 185, 114, 150 y 165, respectivamente. Las longitudes de intrones de ratón son: I-II, 162 pb; II-III, 1253 pb; III-IV, 2981 pb; IV-V, 1281 pb. Los codones humanos I-V tienen longitudes de 19, 191, 114, 147 y 165. Las longitudes de intrones humanos son I-II, 154; II-III, 1047; III-IV, 706; IV-V, 1737. Los datos de la organización genómica son de Tanabe *et al.* (1988) y Yasukawa *et al.* (1987) Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene, *EMBO J.* 9 (10): 2939-2945.

Podría ser razonable suponer que los genes de IL-6 humano y de ratón parecen estar regulados de manera similar basándose en la similitud de su secuencia flanqueante en 5'. Una variedad de tipos de células presentan expresión de IL-6 potenciada en respuesta a IL-1, TNF, PDGF, IFN β , suero, poli(I)poli(C) y cicloheximida (véase, Tanabe *et al.* (1988). La IL-6 en seres humanos media en la respuesta de fase aguda, hematopoyesis, diferenciación de células B, activación, crecimiento y/o diferenciación de células T y/o activación de una variedad de tipos de células (por ejemplo, hepatocitos, fibroblastos, células endoteliales, neuronas, células hipofisarias, linfomas, mielomas, carcinomas de mama, células NK, macrófagos, osteoclastos, etc.) (revisado en, por ejemplo, Heinrich *et al.* (1990), Kishimoto *et al.* (1989) y Keller *et al.* (1996); Sugita *et al.* (1990) Functional Murine Interleukin Receptor with Intracisternal A Particle Gene Product at its Cytoplasmic Domain, *J. Exp. Med.* 171: 2001-2009).

Sin embargo, en la práctica, los ratones transgénicos para IL-6 humana presentan una colección de patologías sustanciales y debilitantes, reflejando una pleiotropía significativa del gen de IL-6. Los ratones transgénicos que comprenden un fragmento de 6,6 kb que contiene el gen de IL-6 humano y un potenciador μ ($E\mu$) producen altas concentraciones de hIL-6 y niveles de IgG1 extremadamente altos (de 120 a 400 veces por encima de ratones de tipo natural), reflejando una desregulación de IL-6 que va acompañada por plasmocitosis, glomerulonefritis mesangio-proliferativa y altos niveles de megacariocitos en la médula ósea (Suematsu *et al.* (1989) IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 7547-7551). La regulación aberrante de IL-6 y/o IL-6R está asociada con mielomas, plasmocitomas, artritis reumatoide, enfermedad de Castleman, glomerulonefritis proliferativa mesangial, mixoma cardíaco, neoplasias de células plasmáticas, psoriasis y otros trastornos (véase, Kishimoto, T. (1989) The Biology of Interleukin-6, *Blood* 74 (1): 1-10; Sugita *et al.* (1990); también, Hirano *et al.* (1990) Biological and clinical aspects of interleukin 6, *Immunology Today* 11 (12): 443-449). La IL-6 también está implicada en el sostenimiento de los niveles de andrógenos intraprostáticos durante el tratamiento de privación de andrógenos de pacientes con cáncer de próstata mediante un mecanismo paracrino y/o autocrino, proporcionando posiblemente un crecimiento de tumor de próstata resistente a la castración (Chun *et al.* (2009) Interleukin-6 Regulates Androgen Synthesis in Prostate Cancer Cells, *Clin. Cancer Res.* 15: 4815-4822).

La proteína humana se codifica como una proteína de 212 aminoácidos, en forma madura una proteína de 184 aminoácidos tras la escisión de una secuencia señal de 28 aminoácidos. Contiene dos sitios de N-glucosilación y dos de O-glucosilación, y la IL-6 humana está fosforilada en algunas células. La proteína de ratón se codifica como una proteína de 211 aminoácidos, en forma madura una proteína de 187 aminoácidos tras la escisión de una secuencia señal de 23 aminoácidos. Están presentes sitios de O-glucosilación, pero no sitios de N-glucosilación (véanse revisiones sobre IL-6, por ejemplo, Heinrich *et al.* (1990) Interleukin-6 and the acute phase response, *Biochem. J.* 265: 621-636.).

La función de IL-6 es pleiotrópica. El receptor de IL-6 se encuentra sobre células B activadas pero según se notifica no sobre células B en reposo. En cambio, la IL-6R se encuentra sobre células T en reposo y según se notifica puede promover la diferenciación, activación y proliferación de células T, incluyendo la diferenciación de células T en linfocitos T citotóxicos en presencia de IL-2.

Ratones con ectodominio de IL-6R/IL-6 humanizado y respuesta de fase aguda mediada por IL-6

En seres humanos, la IL-6 induce la respuesta de fase aguda. Estudios tempranos con hepatocitos humanos establecieron que la IL-6 induce proteínas de fase aguda tales como, por ejemplo, proteína C reactiva (CRP) y amiloide A sérico (SAA) de una manera dependiente de la dosis y dependiente del tiempo (revisado en Heinrich *et al.* (1990) Interleukin-6 and the acute phase response, *Biochem. J.* 265: 621-636). Por tanto, animales no humanos, por ejemplo, ratones o ratas, que comprenden genes de IL-6 e IL-6R humanizados son sistemas útiles para medir la respuesta de fase aguda mediada por IL-6 humana. Tales animales también son útiles para determinar si una sustancia induce una respuesta de fase aguda mediada por IL-6, exponiendo un animal con IL-6/IL-6R humanizado tal como se describe en el presente documento a la sustancia, y midiendo un nivel de una o más proteínas de respuesta de fase aguda (o ARN). En una realización, el animal humanizado se expone a la sustancia en presencia de un antagonista de un IL-6R humano, y se mide un nivel de una o más proteínas de respuesta de fase aguda (o ARN), en el que una reducción en un nivel de una proteína de respuesta de fase aguda (o ARN) en presencia del antagonista de IL-6R humano indica una respuesta de fase aguda mediada por IL-6R humano.

La IL-6 humana puede unirse tanto a IL-6R humano como a IL-6R de ratón; IL-6 de ratón se une a IL-6R de ratón pero no a IL-6R humano (sin unión de mIL-6 a hIL-6R detectable, mientras que hIL-6 puede competir con mIL-6 por la unión a mIL-6R; Coulie *et al.* (1989) High-and low-affinity receptors for murine interleukin 6. Distinct distribution on B and T cells, *Eur. J. Immunol.* 19: 2107-2111); véase también, por ejemplo, Peters *et al.* (1996) The Function of the Soluble Interleukin 6 (IL-6) Receptor *In Vivo*: Sensitization of Human Soluble IL-6 Receptor Transgenic Mice Towards IL-6 and Prolongation of the Plasma Half-life of IL-6, *J. Exp. Med.* 183: 1399-1406). Por tanto, células humanas que portan hIL-6R en un ratón (por ejemplo, en un trasplante xenogénico) no pueden basarse en mIL-6 endógena para llevar a cabo funciones mediadas por IL-6, incluyendo pero sin limitarse al papel de desarrollo de linfocitos o células sanguíneas por IL-6 (por ejemplo, hematopoyesis, activación de células B, activación de células T, etc.).

En un sistema *in vivo* mixto que comprende un gen de IL-6 de ratón de tipo natural y un gen de IL-6R humano (pero no un gen de IL-6R de ratón), no se espera que un inductor de respuesta de fase aguda induzca niveles detectables de proteínas de fase aguda que indicarían una respuesta de fase aguda. Sin embargo, un ratón humanizado tal como se describe en el presente documento, que comprende un gen de IL-6 humanizado y un gen de IL-6R que comprende una secuencia de ectodominio humanizado responderá a un inductor de respuesta de fase aguda y presentará proteínas de respuesta de fase aguda en suero. Ratones de tipo natural para IL-6/IL-6R sometidos a prueba para detectar proteínas de fase aguda en presencia o ausencia del inductor de fase aguda trementina mostraron un aumento dependiente de trementina en las proteínas de fase aguda. Ratones con gen de IL-6 humanizado, pero no IL-6R, no mostraron respuesta de fase aguda en presencia de trementina. Pero ratones que portaban tanto un gen de IL-6 humano como un gen de IL-6R con un ectodominio humanizado presentaron una fuerte respuesta de fase aguda (figura 2). La respuesta de fase aguda mediada por IL-6 era dependiente de IL-6 tanto en ratones de tipo natural (figura 3, parte superior) como en ratones con ectodominio de IL-6R/IL-6 humanizado (figura 3, parte inferior), tal como se evidencia por la capacidad del anticuerpo anti-IL-6R apropiado para suprimir la respuesta de fase aguda a una dosis de anticuerpo suficientemente alta. Por tanto, una doble humanización de IL-6 e IL-6R recapitula la respuesta de fase aguda mediada por IL-6 de tipo natural con respecto a proteínas de fase aguda séricas.

Ratones modificados genéticamente

Se proporcionan ratones modificados genéticamente que expresan una IL-6 humana y/o un receptor de IL-6 humanizado a partir de loci de ratón endógenos, en los que el gen de IL-6 de ratón endógeno y/o el gen receptor de IL-6 de ratón endógeno se han reemplazado con un gen de IL-6 humano y/o una secuencia humana que comprende una secuencia que codifica para un ectodominio de un receptor de IL-6 humano. Los ratones modificados genéticamente expresan la IL-6 humana y/o el receptor de IL-6 humanizado a partir de loci endógenos humanizados que están bajo el control de promotores de ratón y/o elementos reguladores de ratón. El/los reemplazo(s) en los loci de ratón endógenos proporciona(n) animales no humanos que expresan IL-6 humana y un receptor de IL-6 humanizado de manera que no da como resultado la colección de patologías sustanciales observadas en ratones transgénicos para IL-6 conocidas en la técnica.

Se conocen en la técnica ratones transgénicos que expresan IL-6 humana. Sin embargo, padecen generalmente patologías significativas que limitan gravemente su utilidad. Los ratones humanizados tal como se describen en el presente documento expresan una IL-6 humana y/o un receptor de IL-6 humanizado bajo el control de elementos reguladores de ratón endógenos en loci de IL-6 e IL-6R α de ratón endógenos. Estos ratones, en cambio, presentan patrones de expresión con respecto a estos genes que son diferentes de los ratones transgénicos conocidos en la técnica.

El reemplazo de genes no humanos en un animal no humano con secuencias humanas o genes humanos homólogos u ortólogos, en el locus no humano endógeno y bajo el control de elementos reguladores y/o promotores endógenos, puede dar como resultado un animal no humano con cualidades y características que pueden ser sustancialmente diferentes de un animal deficiente y además transgénico típico. En el animal deficiente y además transgénico típico, se elimina o se daña un locus endógeno y se inserta un transgén completamente humano en el genoma del animal y presumiblemente se integra al azar en el genoma. Normalmente, se desconoce la ubicación del transgén integrado; la expresión de la proteína humana se mide mediante la transcripción del gen humano y/o ensayo de proteínas y/o ensayo funcional. Se supone aparentemente que la inclusión en el transgén humano de secuencias humanas en el sentido de 5' y/o en el sentido de 3' es suficiente para proporcionar apoyo adecuado para la expresión y/o regulación del transgén independientemente de dónde termina el transgén en el genoma del animal. Pero en muchos casos el transgén con elementos reguladores humanos se expresa de una manera que no es fisiológica o por lo demás no es satisfactoria, y puede ser realmente perjudicial para el animal. En cambio, los inventores demuestran que un reemplazo con una secuencia humana en un locus endógeno bajo el control de elementos reguladores endógenos proporciona un patrón de expresión fisiológicamente apropiado y un nivel que da como resultado un animal humanizado útil cuya fisiología con respecto al gen reemplazado es valiosa y apropiada y en contexto con la fisiología del animal humanizado.

Óvulos de ratón fertilizados en los que se inyecta un constructo que tiene el promotor H2 de CMH de clase I y un intrón de β -globina que dirige la expresión de un gen de IL-6 de ratón de 695 pb producen según se notifica ratones que expresan de manera constitutiva IL-6 de ratón a niveles relativamente altos (en comparación con ratones de tipo natural) (véase, Woodrofe *et al.* (1992) Long-Term Consequences of Interleukin-6 Overexpression in Transgenic Mice, DNA and Cell Biology 11 (8): 587-592). Pero estos ratones son propensos a desarrollar linfomas asociados con los intestinos, ganglios linfáticos y riñón, así como depósitos esplénicos de amiloide. También presentan maduración de células B anómala (véase, Woodrofe *et al.*, ídem), de modo que se ven comprometidos los estudios de la función de células B. En cambio, ratones tal como se describe en el presente documento que comprenden un reemplazo del gen de IL-6 de ratón con un gen de IL-6 humano en el locus de IL-6 de ratón no son propensos a desarrollar estos linfomas, y los ratones presentan poblaciones de células B aparentemente normales.

Se han notificado ratones (C57BL/6) transgénicos para hIL-6 debido a una inserción al azar de una longitud de 6,6 kb (fragmento de BamHI-Pvu II) de ADN humano que contiene el gen de hIL-6 acoplado con un potenciador de IgM (véase, Suematsu *et al.* (1989) IgG1 plasmocytosis in interleukin 6 transgenic mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7547-7551). Los ratones expresan hIL-6 a entre 800 pg/ml y 20.000 pg/ml en suero, mientras que los ratones de tipo natural expresan normalmente sólo aproximadamente 100 pg/ml de IL-6. Los ratones presentan un aumento de Ig sérica (de 120 a 400 veces con respecto a ratones de tipo natural) y una disminución de albúmina a medida que envejecen. Los ratones padecen una plasmocitosis masiva, presentan esplenomegalia y agrandamiento de ganglios linfáticos, así como la presentación de células plasmáticas y aumento de megacariocitos en la médula ósea. Tras la inspección, lo que parece que son ganglios linfáticos agrandados son en su lugar masas de células plasmáticas anómalas compactadas. Tanto el bazo como el timo presentan proliferación masiva de células plasmáticas, que también se infiltran en partes del pulmón, el hígado y el riñón. El riñón en estos ratones también presenta proliferación de células mesangiales estimulada por IL-6 típica de glomerulonefritis mesangio-proliferativa. De manera similar, ratones (BALB/c) transgénicos para un ADNc de hIL-6 recortado dirigido por un promotor de H-2L^d de ratón insertado aleatoriamente en el genoma presentan plasmocitosis grave (véase, Suematsu *et al.* (1992) Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 232-235). Aunque los ratones C57BL/6 que sobreexpresan hIL-6 no desarrollan plasmocitomas trasplantables (no presentan plasmocitosis), los ratones BL/6 transgénicos sometidos a retrocruzamiento con ratones BALB/c sí que los desarrollan según se notifica.

La transgénesis al azar de un ADNc de hIL-6 dirigido por un promotor del gen de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) da como resultado según se notifica sobreexpresión de hIL-6 en el sistema nervioso central del ratón, lo que también conduce a patologías significativas (véase, Campbell *et al.* (1993) Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10061-10065). Estos ratones presentan astrocitosis reactiva y neuropatología extensas que resultan de la expresión de IL-6 en el SNC debido a la pérdida de control como resultado de la integración al azar de un transgén de IL-6 en un locus de transcripción aparentemente permisivo para el SNC. Aunque la expresión de ADNc de hIL-6 unido a 3'-UTR de β -globina y dirigido por un promotor de enolasa específica de neuronas microinyectado en óvulos de ratón fertilizados (F1 C57BL/6 x BALB/c) produjo ratones con una vida normal y sin defectos neurológicos aparentes que expresaban hIL-6 en neuronas pero no en otras partes (véase, Fattor *et al.* (1994) IL-6 Expression in Neurons of Transgenic Mice Causes Reactive Astrocytosis and Increase in Ramified Microglial Cells But No Neuronal Damage, Eur. J. Neuroscience 7:

Además, los ratones transgénicos dobles (hIL-6 dirigida por promotor de metalotionina de ratón/hIL-6R dirigido por promotor de PEP carboxicinas de rata) presentan una hiperplasia hepatocelular que es según se notifica idéntica a la hiperplasia regenerativa nodular humana con proliferación de hepatocitos sostenida, lo que sugiere fuertemente que IL-6 es responsable de tanto la proliferación de hepatocitos como la transformación hepatocelular patógena (Maione *et al.* (1998) Coexpression of IL-6 and soluble IL-6R causes nodular regenerative hyperplasia and adenomas of the liver, EMBO J. 17 (19): 5588-5597). Debido a que la hiperplasia hepatocelular no se observa según se notifica en ratones transgénicos individuales para hIL-6 y que hIL-6 puede unirse a mL-6R, el hallazgo puede parecer paradójico hasta que se considera que el transgénico doble puede dar como resultado niveles superiores de hIL-6 complejada con IL-6R soluble (en este caso, hIL-6R soluble), complejo que es un inhibidor más potente que IL-6 sola (*idem*).

En contraposición a ratones que son transgénicos para IL-6 humana, los ratones con IL-6 humanizada que comprenden un reemplazo en un locus de IL-6 de ratón endógeno, que conservan elementos reguladores de ratón pero que comprenden una humanización de la secuencia que codifica para IL-6, no presentan las patologías graves de los ratones de la técnica anterior. Los ratones modificados genéticamente que eran heterocigotos u homocigotos para hIL-6 eran normales macroscópicamente.

Se determinó el inmunofenotipo de ratones con un gen de IL-6 humanizado (MAID 760) tal como se describe en los ejemplos y se encontró que tenían números de células B normales en análisis de FACS (linfocitos separados) de células B de bazo usando un panmarcador de células B (CD445R(B220)) (figura 4). Para el bazo, los ratones de tipo natural presentaban un 63% de células B; los ratones heterocigotos para hIL-6 presentaban un 63% de células B; y los ratones homocigotos para hIL-6 en el locus de ratón endógeno presentaban un 63% de células B. Los números de células B para ratones homocigotos para hIL-6 inmunizados con TNP-KLH también eran normales (el 65% para el tipo natural y el 61% para homocigotos para hIL-6).

Las células T esplénicas también eran aproximadamente las mismas que en el tipo natural (figura 5). Los porcentajes de células T esplénicas para T auxiliares/T citotóxicas eran, para el tipo natural el 20%/40% (razón de 1,4:1); para heterocigotos para hIL-6 el 23%/14% (razón de 1,6:1); para homocigotos para hIL-6 el 21%/15% (razón de 1,4:1) (los marcadores fueron CD8a-APC; CD4-FITC). Los ratones homocigotos para hIL-6 inmunizados con TNP-KLH presentaban números de células T esplénicas similares a ratones de tipo natural, es decir, T auxiliares/T citotóxicas eran el 22%/20% (razón de 1,1:1) en comparación con el 21%/19% para el tipo natural (también una razón de 1,1:1).

Los ratones con IL-6 humanizada también presentaban niveles aproximadamente normales de células NK esplénicas en el análisis de FACS (CD11b y DX5) (figura 7). Los heterocigotos para hIL-6 presentaban un 2,2% de células NK y los homocigotos para hIL-6 presentaban un 1,8% de células NK, mientras que los ratones de tipo natural presentaban un 2,4% de células NK. Tras la inmunización con TNP-KLH, los homocigotos presentaban un 1,6% de células NK esplénicas, mientras que los ratones de tipo natural presentaban un 2,1% de células NK esplénicas.

Los ratones con IL-6 humanizada también presentaban niveles normales de células Ly6G/C(Gr1) esplénicas (figura 6). Los heterocigotos para hIL-6 presentaban un 7,0% de células GR1⁺ (el 1,3% de Gr1^{hi}); los homocigotos presentaban un 6,8% de células Gr1⁺ (el 0,9% de Gr1^{hi}), mientras que los ratones de tipo natural presentaban un 8,0% de células Gr1⁺ (el 1,8% de Gr1^{hi}). Los homocigotos para IL-6 inmunizados (inmunizados con TNP-KLH) presentaban un 11% de células Gr1⁺ (el 4,0% de Gr1^{hi}), mientras que los ratones de tipo natural presentaban un 10% de células Gr1⁺ (el 3,0% de Gr1^{hi}).

Los ratones con IL-6 humanizada también presentaban números de células B y T sanguíneas normales en el análisis de FACS (figura 8 y figura 9). FACS con un panmarcador de células B (CD445R(B220)) reveló que los ratones homocigotos para hIL-6 presentaban un 52% de células B en comparación con el 53% del tipo natural; los heterocigotos presentaban un 38% (un promedio de dos tinciones diferentes del 29% y el 47%). Los ratones homocigotos para hIL-6 inmunizados con TNP-KLH dieron números de células B similares (el 43%, en comparación con el 45% para los ratones de tipo natural).

Los ratones con IL-6 humanizada presentaban números de células T sanguíneas normales en el análisis de FACS tal como se mide mediante tinción de CD8a y CD4. Los ratones heterocigotos para hIL-6 presentaban números de T auxiliares/T citotóxicas del 39%/26% (razón de 1,5:1); los ratones homocigotos para hIL-6 presentaban números de Th/Tc del 24%/20% (razón de 1,2:1), mientras que ratones de tipo natural presentaban números de Th/Tc del 26%/20% (razón de 1,3:1). Los ratones homocigotos para hIL-6 inmunizados con TNP-KLH tenían números de Th/Tc del 29%/21% (razón de 1,4:1), mientras que ratones inmunizados de tipo natural tenían números de Th/Tc del 28%/23% (1,2:1).

Los ratones con IL-6 humanizada también presentaban números de células mieloides en sangre que eran similares a los ratones de tipo natural tal como se mide mediante análisis de FACS de sangre de ratón inmunizado y sin tratamiento previo teñida con Ly6G/C(Gr1) y CD11b, así como CD11b y DX5 (figura 10, figura 11 y figura 12). Los ratones heterocigotos para hIL-6 presentaban un % de células Gr⁺ del 10,8%, los homocigotos del 6,9%, mientras

que los ratones de tipo natural presentaban un 9,7%. Homocigotos para hIL-6 inmunizados presentaban números de M1(Ly6G/C(Gr) de 10^1-10^4)/M2(tinción de Ly6G/C(Gr) de aproximadamente 10^2-10^3) del 43%/34%, mientras que los ratones de tipo natural tenían números del 45%/38%. Los gráficos de FACS de CD11b (eje vertical) frente a Ly6G/C (eje horizontal) para ratones homocigotos para hIL-6 inmunizados mostraron un porcentaje de células en los cuadrantes (superior izquierdo/superior derecho/inferior derecho) del 16%/8%/3%, que eran idénticos a los números de cuadrantes del tipo natural inmunizados.

Los ratones con IL-6 humanizada inmunizados con TNP-KLH homocigotos presentaban gráficos de FACS de tinción de CD11b frente a DX5(NK) que eran similares a los ratones de tipo natural inmunizados. El análisis de cuadrantes de gráficos de FACS de sangre (CD11b eje vertical, DX5(NK) eje horizontal) reveló números de los cuadrantes superior izquierdo/superior derecho/inferior derecho del 9,5%/17%/10% para homocigotos para hIL-6 y del 6,5%/17,3%/14% para ratones de tipo natural.

Los ratones con IL-6 humanizada presentaban una respuesta de isotipo que era esencialmente la misma que la observada en ratones de tipo natural. Los niveles de IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgE e IgM tempranos y finales eran aproximadamente los mismos que los observados en ratones de tipo natural. En un experimento, la IgM final era ligeramente superior en ratones humanizados; la IgG3 final también estaba elevada en ratones humanizados.

El desarrollo de células B en ratones con hIL-6 sin tratamiento previo era esencialmente indistinguible del desarrollo en ratones de tipo natural basándose en el análisis de FACS de la tinción de IgM/CD24/B220 de médula ósea (figura 13). La determinación de inmunofenotipos de ratones inmutarios reveló que las poblaciones de marcadores para diversos tipos de células en la progresión del desarrollo de células B eran esencialmente normales en ratones con hIL-6. La progresión de células a partir de células madre hematopoyéticas, progenitores linfoides comunes, células proB, células preB y células B inmaduras y maduras es normal en ratones con hIL-6 (figura 14 y figura 15).

Ejemplos

Ejemplo 1: Reemplazo del gen de IL-6 de ratón endógeno con el gen de hIL-6

El gen de IL-6 humano de 4,8 kb que contiene los exones 1 a 4 del gen de IL-6 humano reemplazó a 6,8 kb del locus del gen de IL-6 murino.

Se construyó un constructo de selección como diana para reemplazar el gen de IL-6 de ratón con el humano en una única etapa de selección como diana usando la tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® (véase, Valenzuela *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech, 21 (6): 652-659). Se obtuvieron ADN de IL-6 de ratón y humana a partir del clon de RPCI-23 de cromosoma artificial bacteriano (BAC) 368C3, y a partir del clon de CTD de BAC 2369M23, respectivamente. En resumen, un constructo de selección como diana linealizado con NotI generado mediante clonación por reparación de huecos que contiene brazos de homología en el sentido de 5' y en el sentido de 3' de IL-6 de ratón que flanquean una secuencia de IL-6 humana de 4,8 kb que se extiende desde ATG en el exón 1 hasta el exón 5 con 16 nucleótidos de secuencia en el sentido de 3' (coordenadas genómicas: NCBIh37.1: ch7:22.766.882 a 22.771.637) y un casete de selección floxed neo, se sometió a electroporación en células madre embrionarias (ES) de ratón F1 H4 (híbrido F1 C57BL/6 x 129). Se sometieron a electroporación adicionalmente células ES correctamente seleccionadas como diana (MAID 790) con un vector de expresión de Cre transitorio para eliminar el casete de selección de fármaco. Se introdujeron clones de células ES seleccionadas como diana sin casete de fármaco (MAID 1428) en un embrión de ratón en el estadio de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véanse, las patentes estadounidenses n.ºs 7.294.754, 7.576.259, 7.659.442 y Poueymirou *et al.* (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25 (1): 91-99). Se identificaron VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ES donadora) que portan el gen de IL-6 humanizado mediante genotipado para detectar la pérdida del alelo de ratón y la ganancia del alelo humano usando una modificación del ensayo de alelos (véase, Valenzuela *et al.* (2003)).

Se identificaron clones de células ES correctamente seleccionadas como diana mediante un ensayo de pérdida de alelo nativo (LONA) (Valenzuela *et al.* 2003) en el que se determinó el número de copias del gen *IL6* nativo, no modificado mediante dos reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas (qPCR) TaqMan™ específicas para secuencias en el gen *IL6* de ratón que se seleccionaron como diana para la selección. Los ensayos de qPCR comprendían los siguientes conjuntos de cebador-sonda (escritos de 5' a 3'): cebador directo en el sentido de 5', TTGCCGGTTT TCCCTTTTCT C (SEQ ID NO: 1); cebador inverso en el sentido de 5', AGGGAAGGCC GTGGTTGTC (SEQ ID NO: 2); sonda en el sentido de 5', FAM-CCAGCATCAG TCCAAGAAG GCAACT-BHQ (SEQ ID NO: 3); cebador directo en el sentido de 3', TCAGAGTGTG GGCGAACAAA G (SEQ ID NO: 4); cebador inverso en el sentido de 3', GTGGCAAAG CAGCCTTAGC (SEQ ID NO: 5); sonda en el sentido de 3', FAM-TCATTCCAGG CCCTTCTTAT TGCATCTG-BHQ (SEQ ID NO: 6); en los que FAM se refiere a la sonda fluorescente 5-carboxifluoresceína y BHQ se refiere al extintor de fluorescencia del tipo extintor de agujero negro (Biosearch Technologies). Se combinó el ADN purificado de clones de células ES que han captado e incorporado el vector de selección como diana en sus genomas con la mezcla madre de expresión génica TaqMan™ (Life Technologies)

según las sugerencias del fabricante en una placa de PCR de 384 pocillos (placa de reacción de 384 pocillos óptica MicroAmp™, Life Technologies) y se sometió a ciclado en un instrumento Prism 7900HT de Applied Biosystems, que recoge los datos de fluorescencia durante el transcurso de las PCR y determina un ciclo umbral (Ct), el ciclo de PCR fraccionado en el que la fluorescencia acumulada alcanza un umbral preestablecido. Se ejecutaron las qPCR específicas de *IL6* en el sentido de 5' y en el sentido de 3' y dos qPCR para genes de referencia no seleccionados como diana para cada muestra de ADN. Se calcularon las diferencias en los valores de Ct (ΔCt) entre cada qPCR específica para *IL6* y cada qPCR de gen de referencia, y entonces se calculó la diferencia entre cada ΔCt y la mediana de ΔCt para todas las muestras sometidas a ensayo para obtener los valores de $\Delta\Delta Ct$ para cada muestra. Se calculó el número de copias del gen *IL6* en cada muestra a partir de la siguiente fórmula: número de copias = $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Un gen correctamente seleccionado como diana, que ha perdido una de sus copias nativas, tendrá un número de copias de gen *IL6* igual a uno. La confirmación de que la secuencia del gen de *IL6* humano reemplazó a la secuencia del gen de *IL6* de ratón delecionada en el alelo humanizado se confirmó mediante un ensayo de qPCR TaqMan™ que comprende los siguientes conjuntos de cebador-sonda (escritos de 5' a 3'): el cebador directo humano, CCCCACTCCACTGGAATTTG (SEQ ID NO: 7); el cebador inverso humano, GTTCAACCACAGCCAGGAAAG (SEQ ID NO: 8); y la sonda humana, FAM-AGCTACAACCTCATTGGCATCCTGGCAA-BHQ (SEQ ID NO: 9).

Se usó el mismo ensayo de LONA para someter a ensayo el ADN purificado de biopsias de cola para ratones derivados de las células ES seleccionadas como diana para determinar sus genotipos de *IL6* y confirmar que el alelo de *IL6* humanizado se había transmitido a través de la línea germinal. Se crían dos crías heterocigotas para el reemplazo para generar un ratón que es homocigoto para el reemplazo del gen de *IL-6* de ratón endógeno por el gen de *IL-6* humano. Para la determinación de fenotipos, se usan crías que son homocigotas para el reemplazo.

La unión en el sentido de 5' del locus murino y la secuencia que contiene el gen de hIL-6 se diseña para que esté dentro de 5'-AATTAGAGAG TTGACTCCTA ATAAATATGA GACTGGGGAT GTCTGTAGCT CATTCTGCTC TGGAGCCCAC CAAGAACGAT AGTCAATTC AGAAACCGCT ATGAACTCCT TCTCCACAAG TAAGTGCAGG AAATCCTTAG CCCTGGAAC TCCAGCGCG GTCGAGCCCT GTGTGAGGGA GGGGTGTGTG GCCCAGG (SEQ ID NO: 10), en la que el nucleótido de ratón final antes del primer nucleótido del gen humano es la "T" en CCGCT, y el primer nucleótido de la secuencia humana es la primera "A" en ATGAA. La unión en el sentido de 3' de la secuencia que contiene el gen de hIL-6 y el locus murino se diseña para que esté dentro de 5'-TTTTAAAGAA ATATTTATAT TGTATTTATA TAATGTATAA ATGGTTTTTA TACCAATAAAA TGGCATTTTA AAAAATTCAG CAACTTTGAG TGTGTACGC TCCCGGGCTC GATAACTATA ACGGTCCTAA GGTAGCGACT CGAGATAACT T-3' (SEQ ID NO: 11), en la que el nucleótido final de la secuencia humana está con la "G" final en TCACG y el primer nucleótido de la secuencia de ratón es la primera "C" en CTCCC; la región de unión en el sentido de 3' también contenía un sitio loxP en el extremo 3' (cuyo comienzo se muestra) para la eliminación de un casete neo dirigido por el promotor de ubiquitina floxed. La unión del casete neo con el locus de *IL-6* de ratón se diseña para que esté dentro de 5'-TATACGAAGT TATCCTAGGT TGGAGCTCCT AAGTTACATC CAAACATCCT CCCCCAAATC AATAATTAAG CACTTTTTAT GACATGTAAA GTTAAATAAG AAGTGAAAGC TGCAGATGGT GAGTGAGA (SEQ ID NO: 12), en la que la "C" final de AGCTC es el nucleótido final del casete neo; el primer nucleótido del genoma de ratón tras el casete es la "C" inicial de CTAAG.

Ejemplo 2: Determinación de inmunofenotipos de ratones con hIL-6 inmunizados y sin tratamiento previo: células B

Se analizaron ratones homocigotos para el reemplazo del gen de hIL-6 para determinar células B (DC445R(B220)). Se tiñeron fracciones de linfocitos separados de preparaciones de células de bazo de ratones con hIL-6 inmunizados (TNP-KLH) y sin tratamiento previo y se determinó su inmunofenotipo usando citometría de flujo. El análisis de FACS mostró que el porcentaje de células B de la preparación de células de bazo tal como se mide mediante tinción de CD45R(B220)-FITC era aproximadamente el mismo (el 63% de células) para las preparaciones a partir de heterocigotos para hIL-6 y homocigotos para hIL-6 de tipo natural sin tratamiento previo. Para ratones inmunizados, las células B representaban aproximadamente el 65% de las células totales de la preparación de células de bazo en ratones de tipo natural, y aproximadamente el 61% de las células totales en homocigotos para hIL-6. Los bazos de ratones con hIL-6 (tanto sin tratamiento previo como inmunizados) contienen una población de células B que es aproximadamente del mismo tamaño que la población de células B esplénicas en ratones de tipo natural.

Se tiñó médula ósea de heterocigotos para hIL-6 y homocigotos para hIL-6 de tipo natural con marcadores de células B (CD45R(B220)-APC, CD24(HSA)-PE o CD43 conjugado con un colorante y/o IgM (IgM-FITC). El desarrollo de células B en médula ósea de ratones normales se verá reflejado en marcadores de superficie a medida que la células progresa desde células madre hasta células pro-B tempranas hasta células pro-B tardías, hasta células pre-B grandes hasta células pre-B pequeñas hasta células B inmaduras y finalmente hasta células B maduras. Las células pro-B progenitoras de linfocitos comunes expresarán CD45R, y en fases posteriores expresarán IgM como células B inmaduras y posteriormente como maduras. Por tanto, las células B teñidas con CD45R y teñidas con anti-IgM deben revelar un patrón característico del desarrollo de células B. La médula ósea de homocigotos y heterocigotos para hIL-6 presentaba un patrón de tinción de CD45R(B220)-APC y anti-IgM-FITC que era esencialmente indistinguible de la médula ósea de tipo natural, mostrando poblaciones de células B que se teñían de manera positiva para CD45R(B220) e IgM, o CD45R(B220) solo. Las subpoblaciones de células B en médula ósea de ratones con hIL-6 reveladas mediante tinción de FACS eran similares a aquéllas en ratones de tipo natural (tabla

1; véase también la figura 13).

	Tabla 1. Células B en médula ósea de ratones sin tratamiento previo		
	Ratón de tipo natural (%)	Ratón con hIL-6	
		Heterocigoto (%)	Homocigoto (%)
CLP-ProB	40	29	32
PreB-B inmaduras	12,3	19,3	15,3
B maduras	6,4	6,5	6,7

5 La tinción para CD24 (véase la figura 14) reveló el patrón (normal) mostrado en la tabla 2, indicando un desarrollo normal en la médula ósea.

	Tabla 2. Células B en médula ósea de ratones sin tratamiento previo		
	Ratón de tipo natural (%)	Ratón con hIL-6	
		Heterocigoto (%)	Homocigoto (%)
HSC-CLP en desarrollo	46,6	46	43
CLP maduras/ProB tempranas	10,2	9,0	10,1
ProB tardías, PreB, B inmaduras	7,2	11,6	10,7
B maduras	14,1	14,9	17

10 La tinción para CD43 (véase la figura 15) reveló el patrón (normal) mostrado en la tabla 3, indicando un desarrollo normal en la médula ósea.

	Tabla 3. Células B en médula ósea de ratones sin tratamiento previo		
	Ratón de tipo natural (%)	Ratón con hIL-6	
		Heterocigoto (%)	Homocigoto (%)
Células PreBII-B inmaduras	28,4	21,4	21,2
Células B maduras	8,1	11,5	8,0
ProB-PreBI	3,4	4,3	4,7

Por tanto, la determinación de inmunofenotipos de ratones con hIL-6 sin tratamiento previo reveló que el desarrollo de células B en tales ratones es esencialmente normal.

15 Ejemplo 3: Reemplazo de la secuencia génica de ectodominio de IL-6R α de ratón endógeno con la secuencia génica de ectodominio de hIL-6R α

20 El gen de IL-6R α humano de 45 kb que contiene los exones 1 a 8 del gen de IL-6R α humano reemplazó a 35,4 kb del locus del gen de IL-6R α murino. Se conservaron los exones 9 y 10 de ratón; sólo se humanizaron los exones 1-8. En total, se reemplazaron 35.384 nt de la secuencia de ratón por 45.047 nt de la secuencia humana.

25 Se construyó un constructo de selección como diana para reemplazar el gen de IL-6R α de ratón con el humano en una única etapa de selección como diana usando la tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE[®] (véase, Valenzuela *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech, 21 (6): 652-659). Se obtuvieron ADN de IL-6R α de ratón y humano a partir del clon de RPCI-23 de cromosoma artificial bacteriano (BAC) 125J8, y a partir del clon de CTD de BAC 2192J23, respectivamente. En resumen, un constructo de selección como diana linealizado con NotI generado mediante clonación por reparación de huecos que contiene brazos de homología en el sentido de 5' y en el sentido de 3' de IL-6R α de ratón que flanquean una secuencia de IL-6R α humana de 45 kb que se extiende desde ATG en el exón 1 hasta el exón 8 con 69 nucleótidos de secuencia en el sentido de 3' y un casete de selección floxed neo, se sometió a electroporación en células madre embrionarias (ES) de ratón F1 H4 (híbrido F1 C57BL/6 x 129). Se sometieron a electroporación adicionalmente células ES correctamente seleccionadas como diana (MAID 794) con un vector de expresión de Cre transitorio para eliminar el casete de selección de fármaco. Se introdujeron clones de células ES seleccionadas como diana sin casete de fármaco (MAID 1442) en un embrión de ratón en el estadio de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE[®] (véanse, las patentes estadounidenses n.ºs 7.294.754, 7.576.259, 7.659.442 y

Poueymirou *et al.* (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25 (1): 91-99). Se identificaron VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ES donadora) que portan el gen de IL-6R α humanizado mediante genotipado para detectar la pérdida del alelo de ratón y la ganancia del alelo humano usando una modificación del ensayo de alelos (véase, Valenzuela *et al.* (2003)).

Se identificaron clones de células ES correctamente seleccionadas como diana mediante un ensayo de pérdida de alelo nativo (LONA) (Valenzuela *et al.* 2003) en el que se determinó el número de copias del gen *IL6* nativo, no modificado, mediante dos reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas (qPCR) TaqMan™ específicas para secuencias en el gen *IL6* de ratón que se seleccionaron como diana para la delección. Los ensayos de qPCR comprendían los siguientes conjuntos de cebador-sonda (escritos de 5' a 3'): cebador directo en el sentido de 5', GCCCTAGCAT GCAGAATGC (SEQ ID NO: 13); cebador inverso en el sentido de 5', AAGAGGTCCC ACATCCTTTG C (SEQ ID NO: 14); sonda en el sentido de 5', CCCACATCCA TCCCAATCCT GTGAG (SEQ ID NO: 15); cebador directo en el sentido de 3', GAGCTTGCCC CCAGAAAGG (SEQ ID NO: 16); cebador inverso en el sentido de 3', CGGCCACATC TCTGGAAGAC (SEQ ID NO: 17); sonda en el sentido de 3', CATGCACTGC CCCAAGTCTG GTTTCAGT (SEQ ID NO: 18). Se combinó ADN purificado de clones de células ES que han captado e incorporado el vector de selección como diana en sus genomas con la mezcla madre de expresión génica TaqMan™ (Life Technologies) según las sugerencias del fabricante en una placa de PCR de 384 pocillos (placa de reacción de 384 pocillos óptica MicroAmp™, Life Technologies) y se sometió a ciclado en un instrumento Prism 7900HT de Applied Biosystems, que recoge los datos de fluorescencia durante el transcurso de las PCR y determina un ciclo umbral (Ct), el ciclo de PCR fraccionado en el que la fluorescencia acumulada alcanza un umbral preestablecido. Se ejecutaron las qPCR específicas de IL-6R α en el sentido de 5' y en el sentido de 3' y dos qPCR para genes de referencia no seleccionados como diana para cada muestra de ADN. Se calcularon las diferencias en los valores de Ct (Δ Ct) entre cada qPCR específica para IL-6R α y cada qPCR de gen de referencia, y entonces se calculó la diferencia entre cada Δ Ct y la mediana de Δ Ct para todas las muestras sometidas a ensayo para obtener los valores de $\Delta\Delta$ Ct para cada muestra. Se calculó el número de copias del gen *IL6* en cada muestra a partir de la siguiente fórmula: número de copias = $2 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Un gen correctamente seleccionado como diana, que ha perdido una de sus copias nativas, tendrá un número de copias del gen de IL-6R α igual a uno. La confirmación de que la secuencia génica de IL-6R α humano reemplazó a la secuencia génica de IL-6R α de ratón delecionada en el alelo humanizado se confirmó mediante un ensayo de qPCR TaqMan™ que comprende los siguientes conjuntos de cebador-sonda (escritos de 5' a 3'): el cebador directo humano, GGAGAGGGCA GAGGCACTTA C (SEQ ID NO: 19); el cebador inverso humano, GGCCAGAGCC CAAGAAAAG (SEQ ID NO: 20); y la sonda humana, CCCGTTGACT GTAATCTGCC CCTGG (SEQ ID NO: 21).

Se usó el mismo ensayo de LONA para someter a ensayo el ADN purificado de biopsias de cola para ratones derivados de las células ES seleccionadas como diana para determinar sus genotipos de IL-6R α y confirmar que el alelo de IL-6R α humanizado se había transmitido a través de la línea germinal. Se crían dos crías heterocigotas para el reemplazo para generar un ratón que es homocigoto para el reemplazo del gen de IL-6R α de ratón endógeno por el gen de IL-6R α humano (ectodominio). Para la determinación de fenotipos, se usan crías que son homocigotas para el reemplazo.

La unión en el sentido de 5' del locus murino y la secuencia que contiene el gen de hIL-6R α se diseña para que esté dentro de 5'-CGAGGGCGAC TGCTCTCGCT GCCCAGTCT GCCGGCCGCC CGGCCCCGGC TGCGGAGCCG CTCTGCCGCC CGCGTCCCG CGTAGAAGGA AGCATGCTGG CCGTCCGCTG CGCGCTGCTG GCTGCCCTGC TGGCCGCGCC GGGAGCGGCG CTGGCCCAA GGCGCTGCC TCGCAGGGT AAGGGCTTCG G (SEQ ID NO: 22), en la que el nucleótido de ratón final antes del primer nucleótido del gen humano es la "C" en GAAGC, y el primer nucleótido de la secuencia humana es la primera "A" en ATGCT. La unión en el sentido de 3' de la secuencia que contiene el gen de hIL-6 y el locus murino se diseña para que esté dentro de 5'-CAAGATTATT GGAGTCTGAA ATGGAATACC TGTTGAGGGA AATCTTTATT TTGGGAGCCC TTGATTTCAA TGCTTTTGAT TCCCTATCCC TGCAAGACCC GGGCTCGATA ACTATAACGG TCCTAAGGTA GCGACTCGAG ATAACCTC-3' (SEQ ID NO: 23), en la que el nucleótido final de la secuencia humana está con la "A" final en CAAGA y el primer nucleótido de la secuencia de ratón es la primera "C" en CCCGG; la región de unión en el sentido de 3' también contenía un sitio loxP en el extremo 3' para la eliminación de un casete neo dirigido por el promotor de ubiquitina floxed. El primer nucleótido del sitio loxP es la primera "A" en ATAAC. La unión del casete neo con el locus de IL-6R α de ratón se diseña para que esté dentro de 5'-TATACGAAGT TATCCTAGT TGGAGCTCTA CTCCATATGC TCACTGCCG TTGTTTGCTA CGATACGGTG AGGCCCGTGC GAAGAGTGGC ACAGATCAGG AGGCTTATGT GGTCAGTCCA CAGTATGGC (SEQ ID NO: 24), en la que la "C" final de AGCTC es el nucleótido final del casete neo; el primer nucleótido del genoma de ratón tras el casete es la "T" inicial de TACTC.

REIVINDICACIONES

1. Ratón modificado genéticamente que comprende un reemplazo en un locus de IL-6 de ratón endógeno de un gen de ratón que codifica para IL-6 con un gen humano que codifica para IL-6 humana, en el que el gen humano que codifica para IL-6 humana está bajo el control de elementos reguladores de ratón endógenos en el locus de IL-6 de ratón endógeno.
2. Ratón modificado genéticamente según la reivindicación 1, en el que el gen humano que codifica para IL-6 humana comprende los exones 1 a 5 del gen de IL-6-humano encontrado en el cromosoma artificial bacteriano CTD-2369M23.
3. Ratón modificado genéticamente según la reivindicación 1, en el que el ratón expresa un IL-6R α de ratón.
4. Ratón modificado genéticamente según la reivindicación 1, en el que el ratón expresa un IL-6R α humanizado en el que el gen de IL-6R α de ratón endógeno se ha reemplazado con una secuencia humana que comprende una secuencia que codifica para un ectodominio de un IL-6R α humano.
5. Ratón modificado genéticamente según la reivindicación 1, en el que el ratón no presenta una característica seleccionada de plasmocitosis, glomeruloesclerosis, glomerulonefritis, insuficiencia renal, hipergammaglobulinemia, megacariocitos elevados en el bazo, megacariocitos elevados en la médula ósea, esplenomegalia, agrandamiento de ganglios linfáticos, células plasmáticas anómalas compactadas, y una combinación de los mismos.
6. Ratón modificado genéticamente según la reivindicación 4, en el que el IL-6R α humanizado comprende un ectodominio humano.
7. Ratón modificado genéticamente según la reivindicación 6, en el que el IL-6R α humanizado comprende un dominio transmembrana de ratón y un dominio citoplasmático de ratón.
8. Ratón modificado genéticamente según la reivindicación 1, en el que el ratón comprende una célula que expresa un IL-6R α que comprende un ectodominio humano sobre la superficie de la célula.
9. Ratón modificado genéticamente, que comprende una humanización de un gen de IL-6R α de ratón endógeno, en el que la humanización comprende un reemplazo de una secuencia que codifica para ectodominio de IL-6R α de ratón con una secuencia que codifica para ectodominio de IL-6R α humano en el locus de IL-6R α de ratón endógeno, y en el que el gen de IL-6R α humanizado está bajo el control de elementos reguladores de ratón endógenos.
10. Ratón modificado genéticamente según la reivindicación 9, en el que se reemplaza una secuencia de ratón contigua que comprende los exones de ratón 1 a 8 con un fragmento genómico contiguo de una secuencia de IL-6R α humana que codifica para un ectodominio de IL-6R α humano.
11. Ratón modificado genéticamente según la reivindicación 10, en el que el fragmento genómico contiguo de la secuencia de IL-6R α humano que codifica para el ectodominio se encuentra en el cromosoma artificial bacteriano CTD-2192J23.
12. Ratón modificado genéticamente según la reivindicación 9, que comprende además un gen de IL-6 humanizado que comprende un reemplazo en un locus de IL-6 de ratón endógeno de un gen de ratón que codifica para IL-6 con un gen humano que codifica para IL-6 humana.
13. Ratón modificado genéticamente según la reivindicación 12, en el que el gen de IL-6 humanizado está bajo el control de elementos reguladores de ratón endógenos.
14. Método para preparar un ratón humanizado, que comprende reemplazar una secuencia génica de ratón que codifica para IL-6 de ratón con un gen humano que codifica para IL-6 humana de modo que el gen de IL-6 humano está bajo el control de elementos reguladores de ratón endógenos.
15. Método para preparar un ratón humanizado, que comprende reemplazar todos los exones de ratón que codifican para secuencias de ectodominio de IL-6R α de ratón con un fragmento genómico humano que codifica para ectodominio de IL-6R α humano para formar un gen de IL-6R α humanizado, en el que el gen de IL-6R α humanizado está bajo el control de elementos reguladores de ratón endógenos.
16. Ratón modificado genéticamente que comprende un gen de IL-6R α humanizado que comprende un reemplazo de una secuencia que codifica para ectodominio de ratón con una secuencia de ectodominio humano, en el que el gen de IL-6R α humanizado comprende una secuencia transmembrana de ratón y una secuencia citoplasmática de ratón; en el que el ratón comprende además un gen que codifica para una IL-6 humana, en el que los genes que codifican para IL-6 humana e IL-6R α humanizado están bajo el control de elementos reguladores de ratón

endógenos.

17. Ratón modificado genéticamente según la reivindicación 16, en el que el ratón no expresa un IL-6R α de ratón y no expresa una IL-6 de ratón.

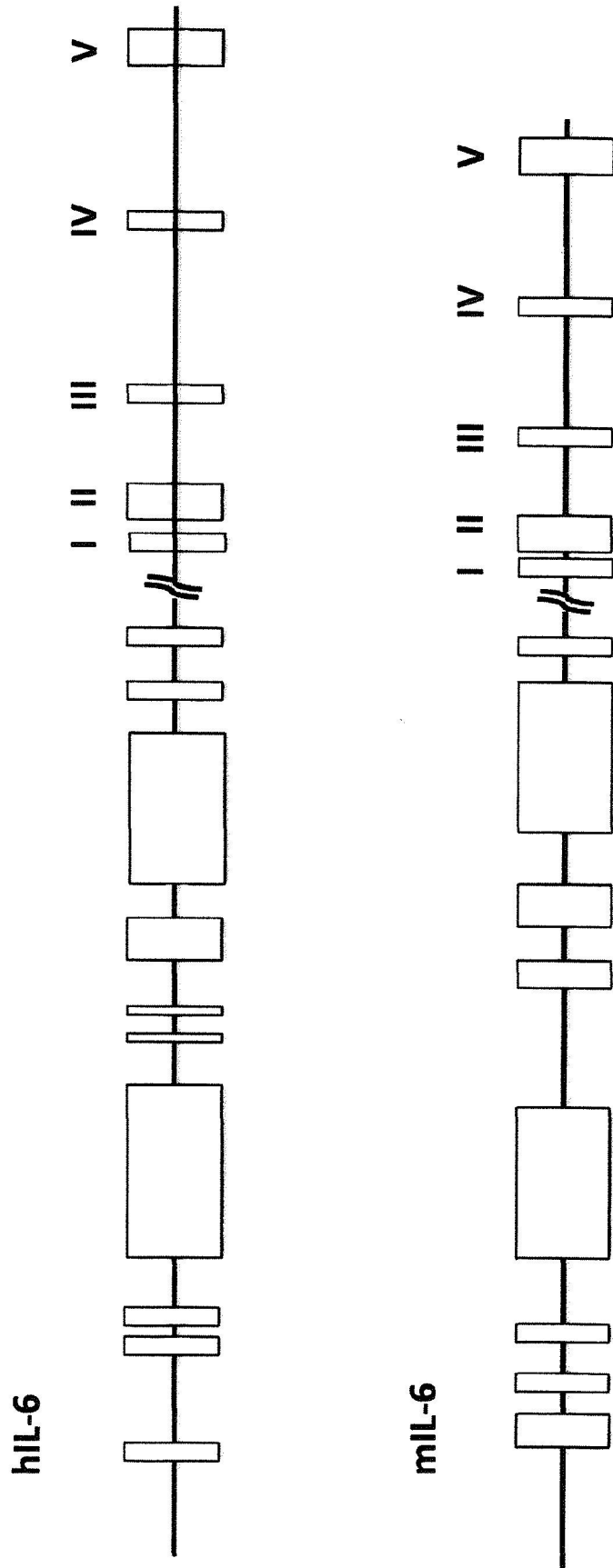


FIG. 1

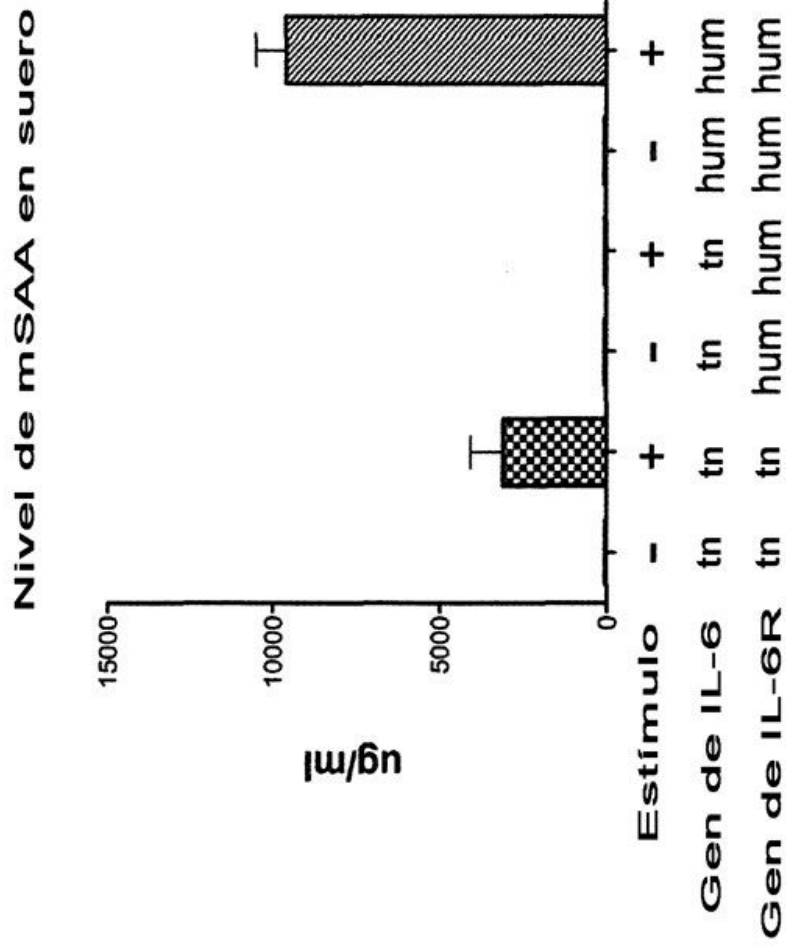


FIG. 2

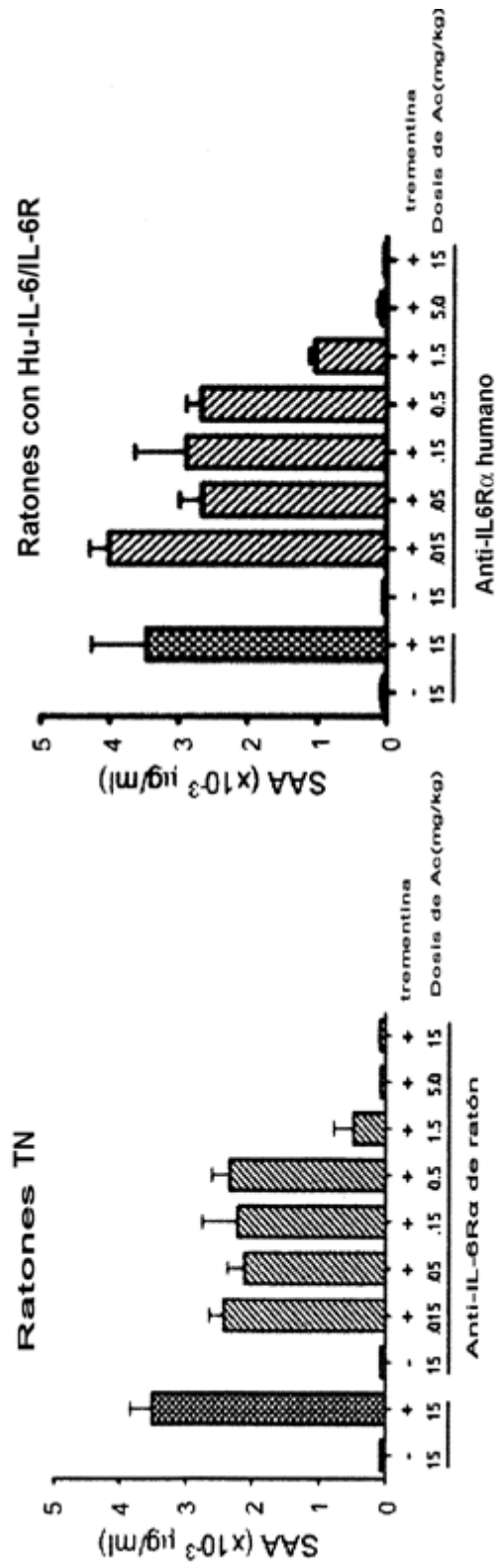


FIG. 3

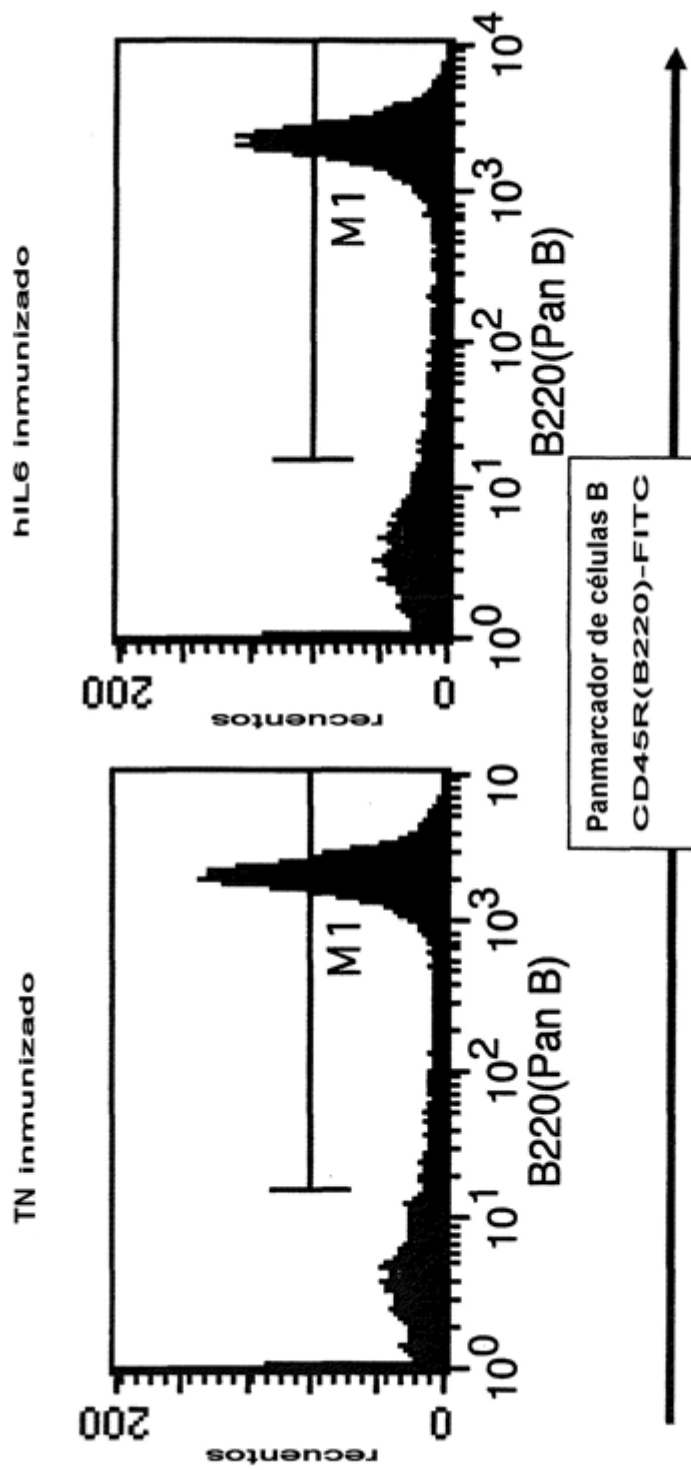


FIG. 4

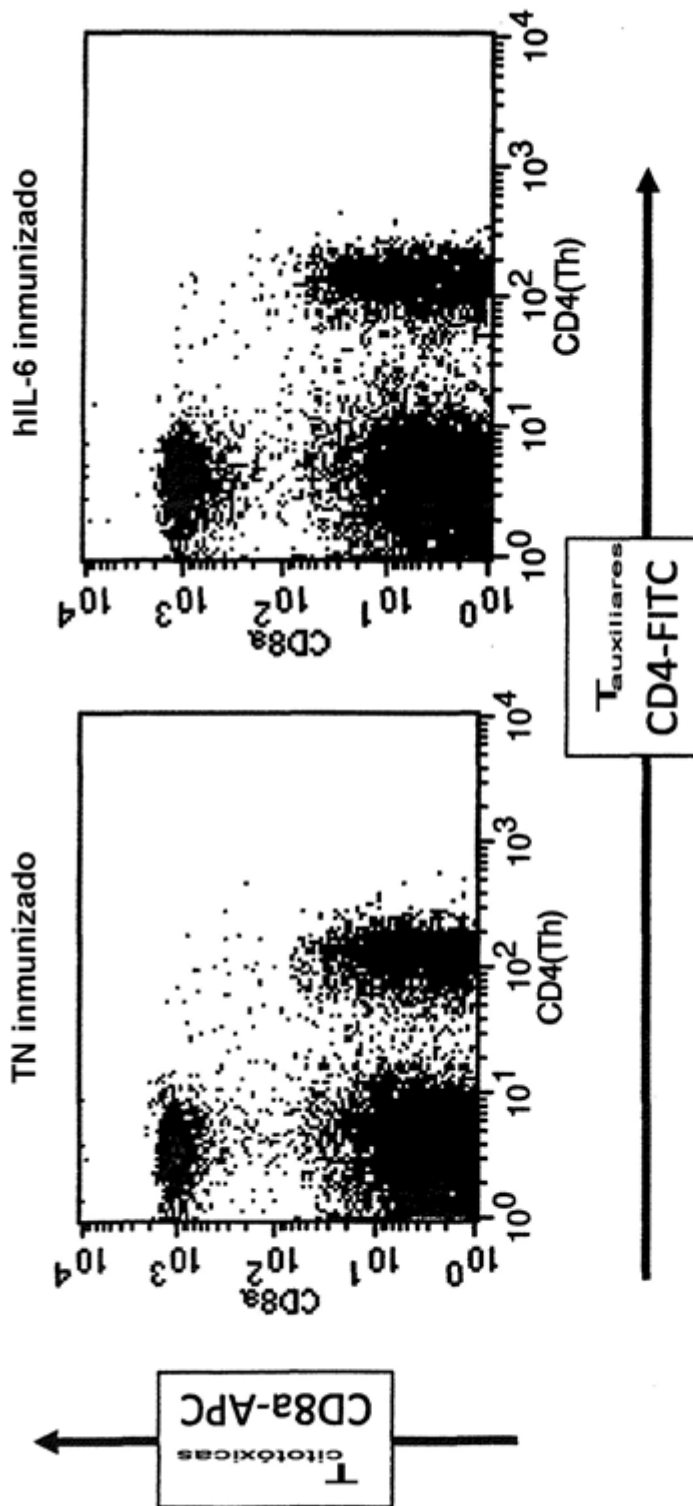


FIG. 5

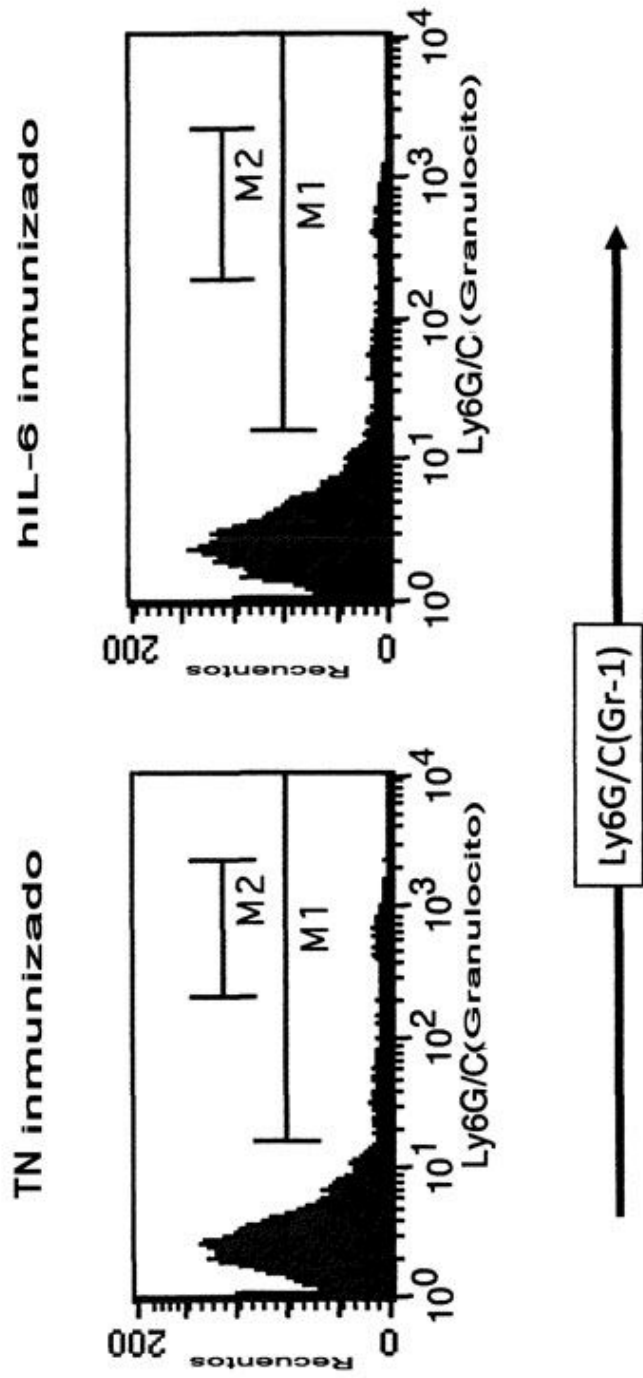


FIG. 6

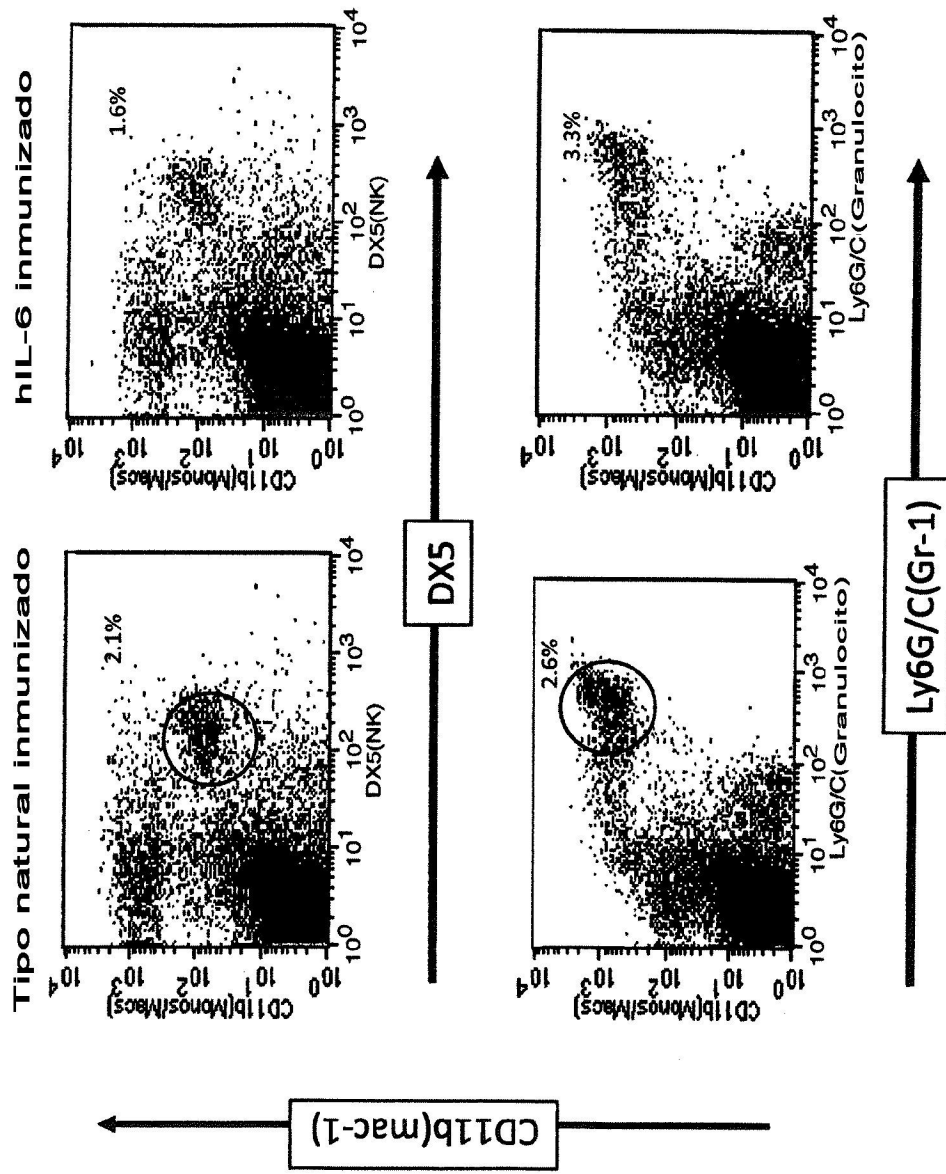


FIG. 7

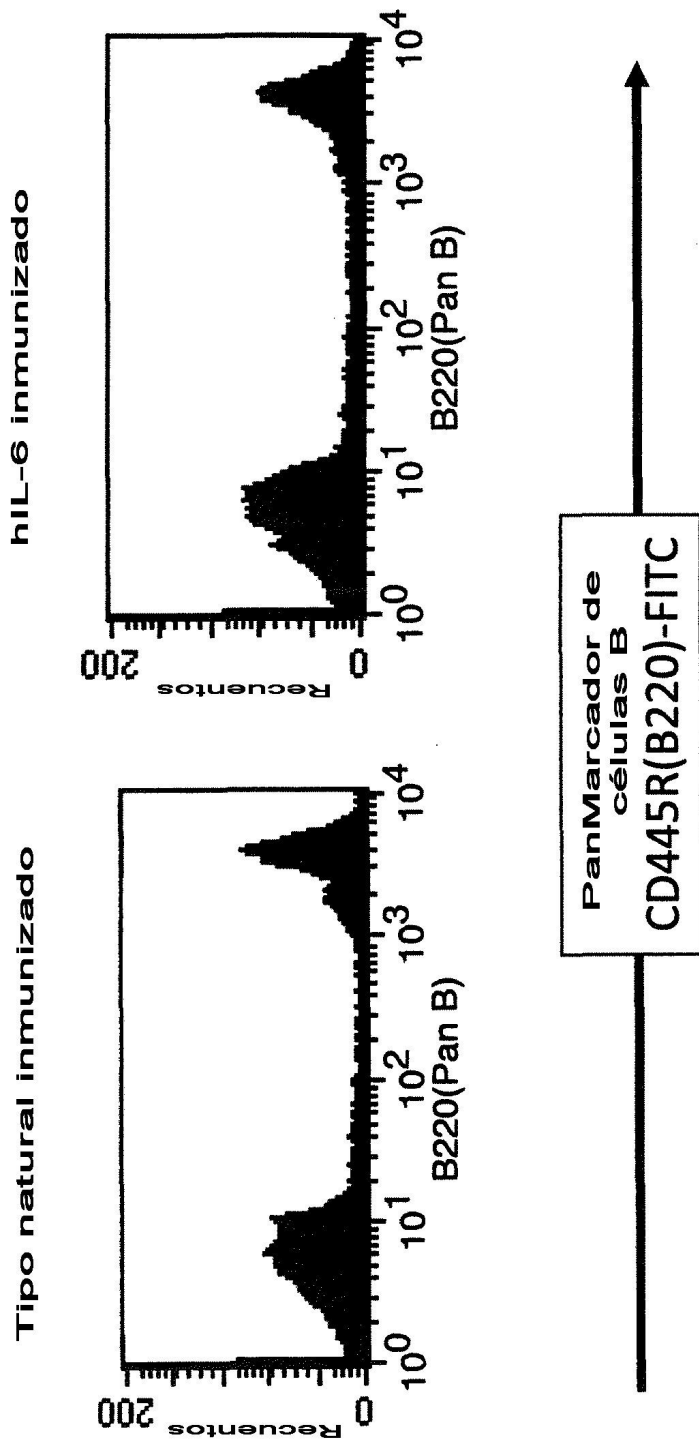


FIG. 8

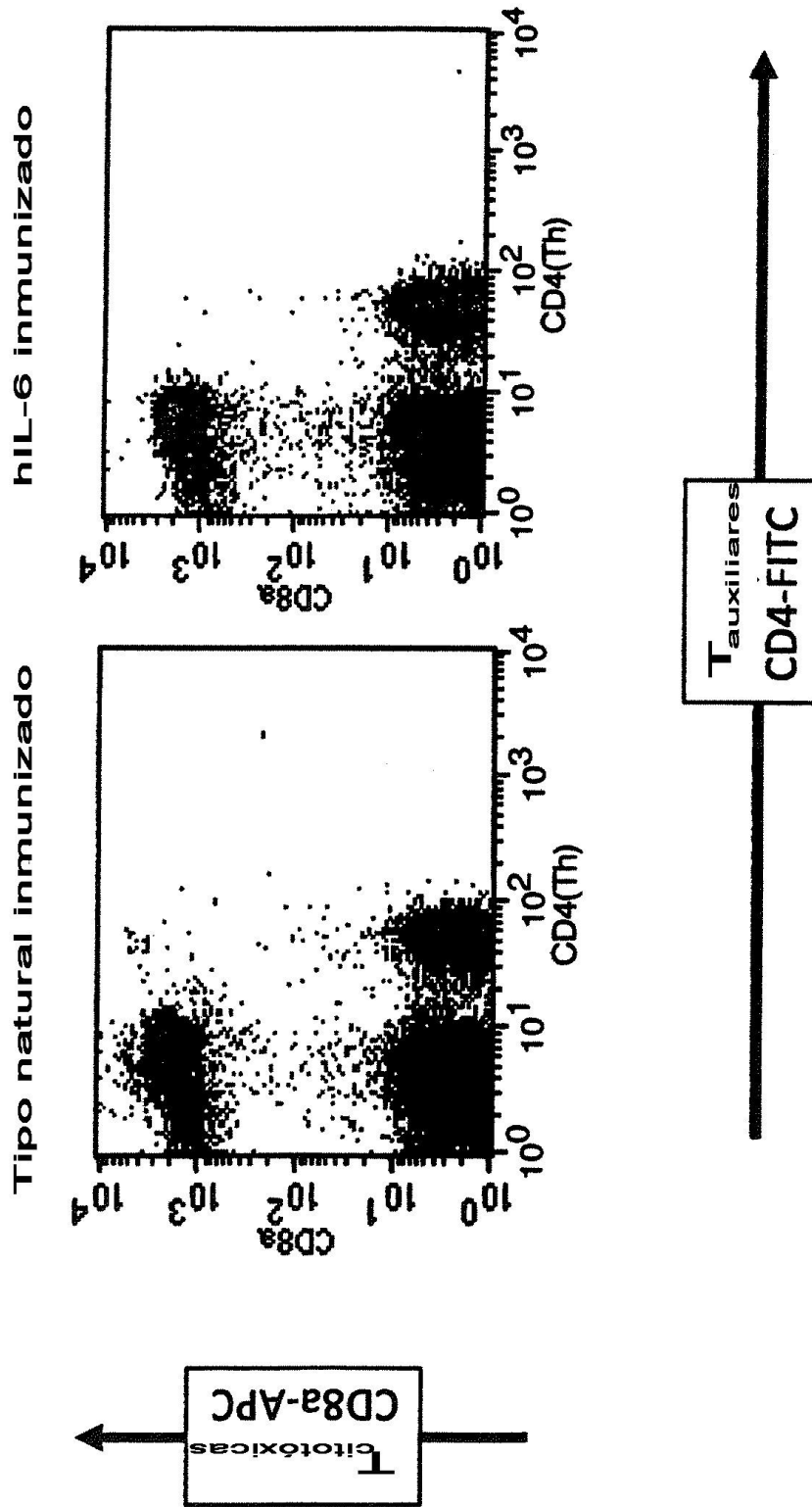


FIG. 9

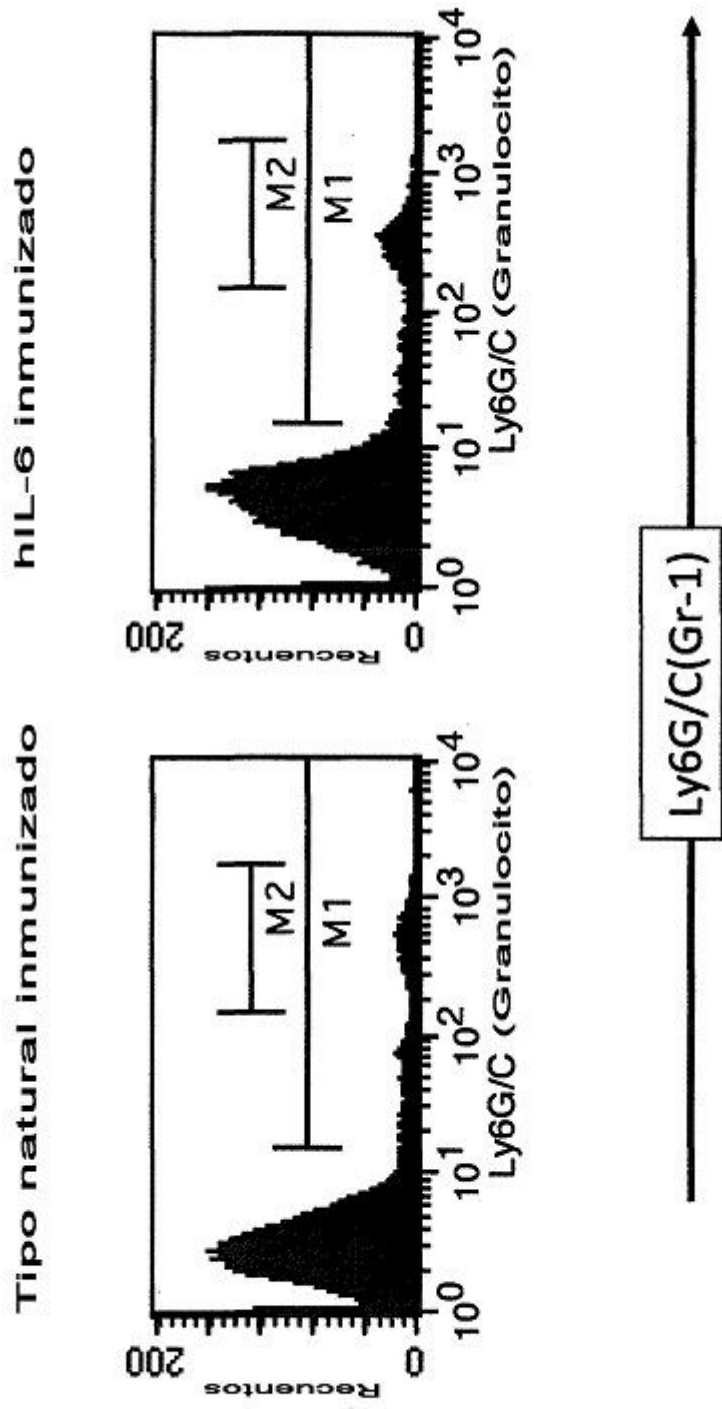


FIG. 10

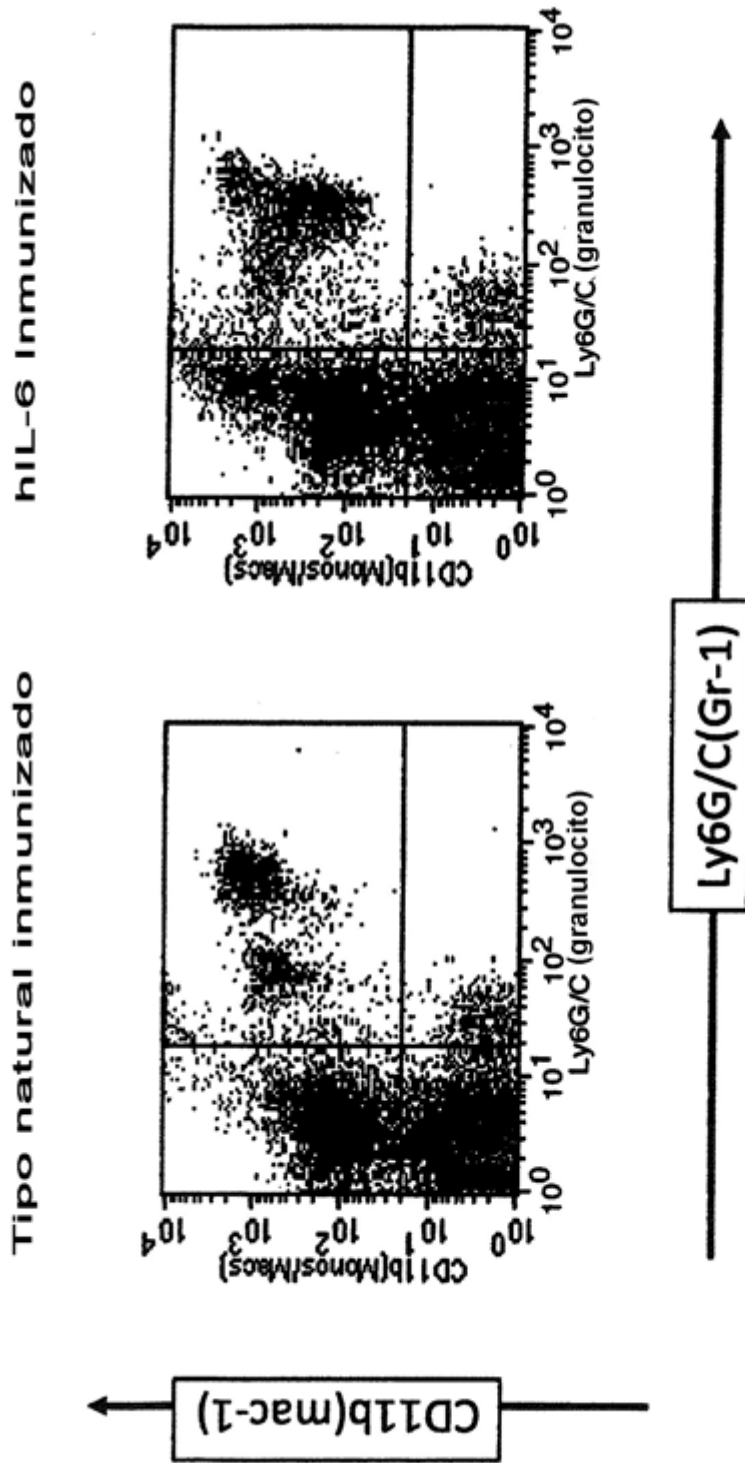


FIG. 11

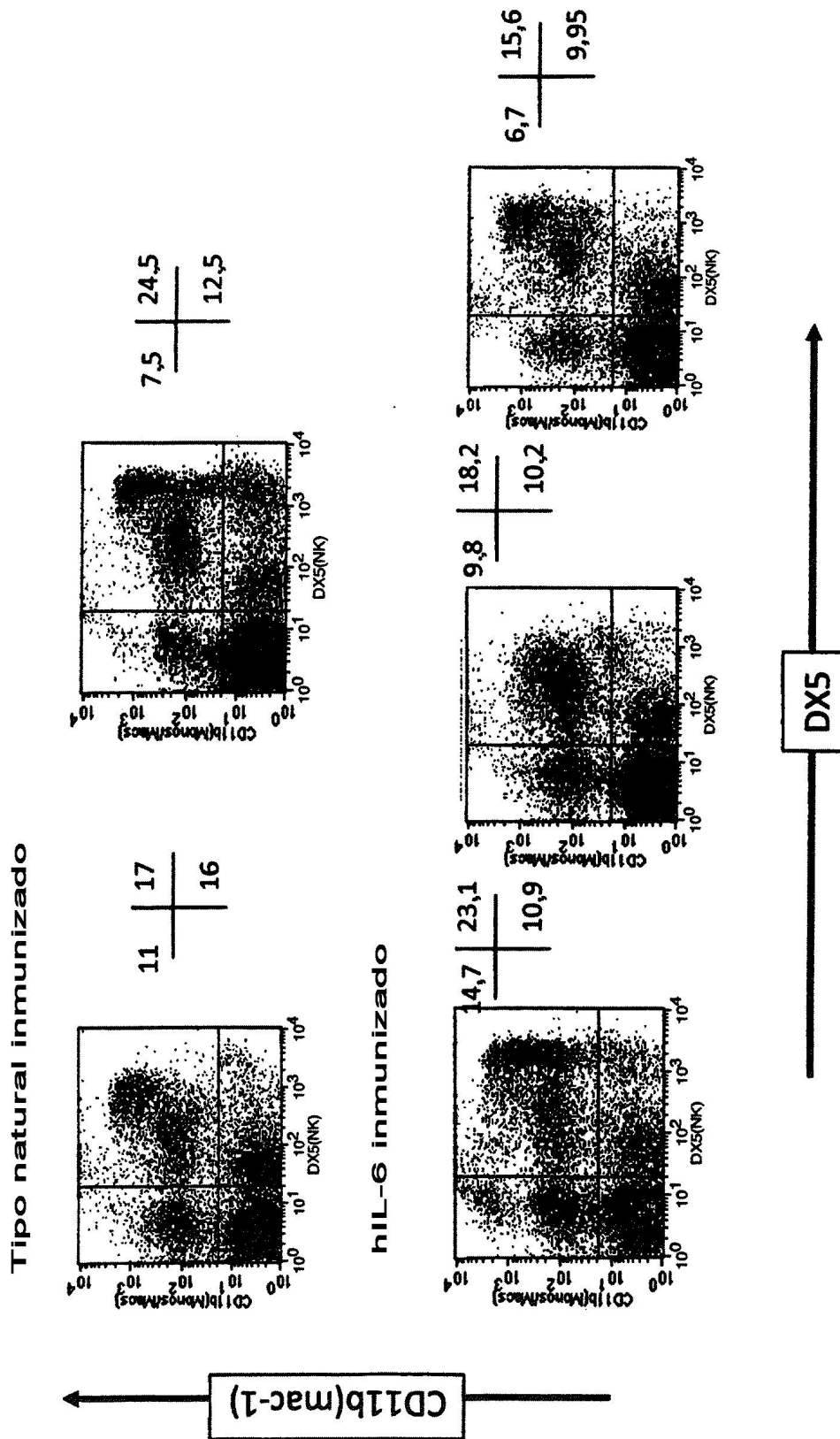


FIG. 12

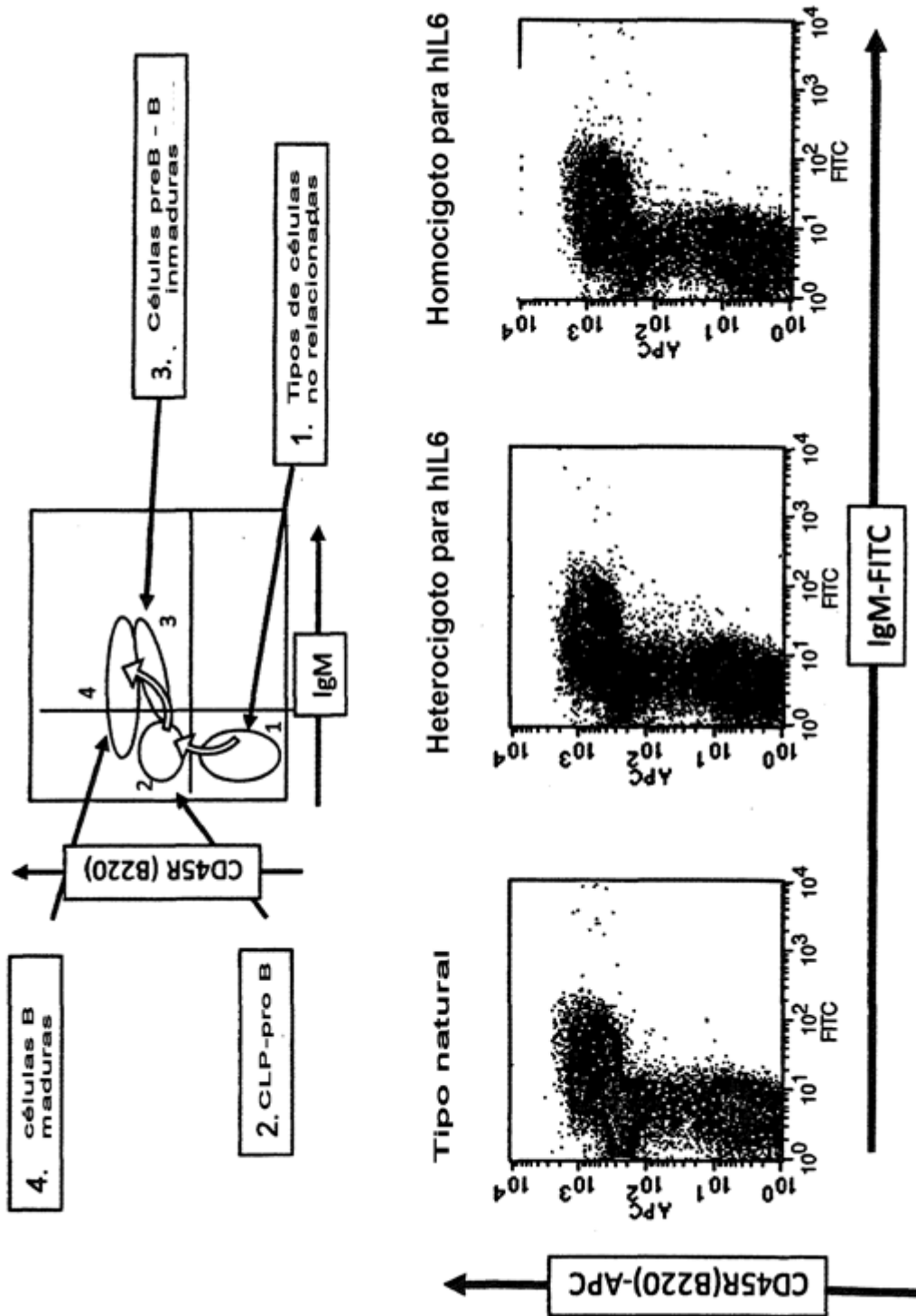


FIG. 13

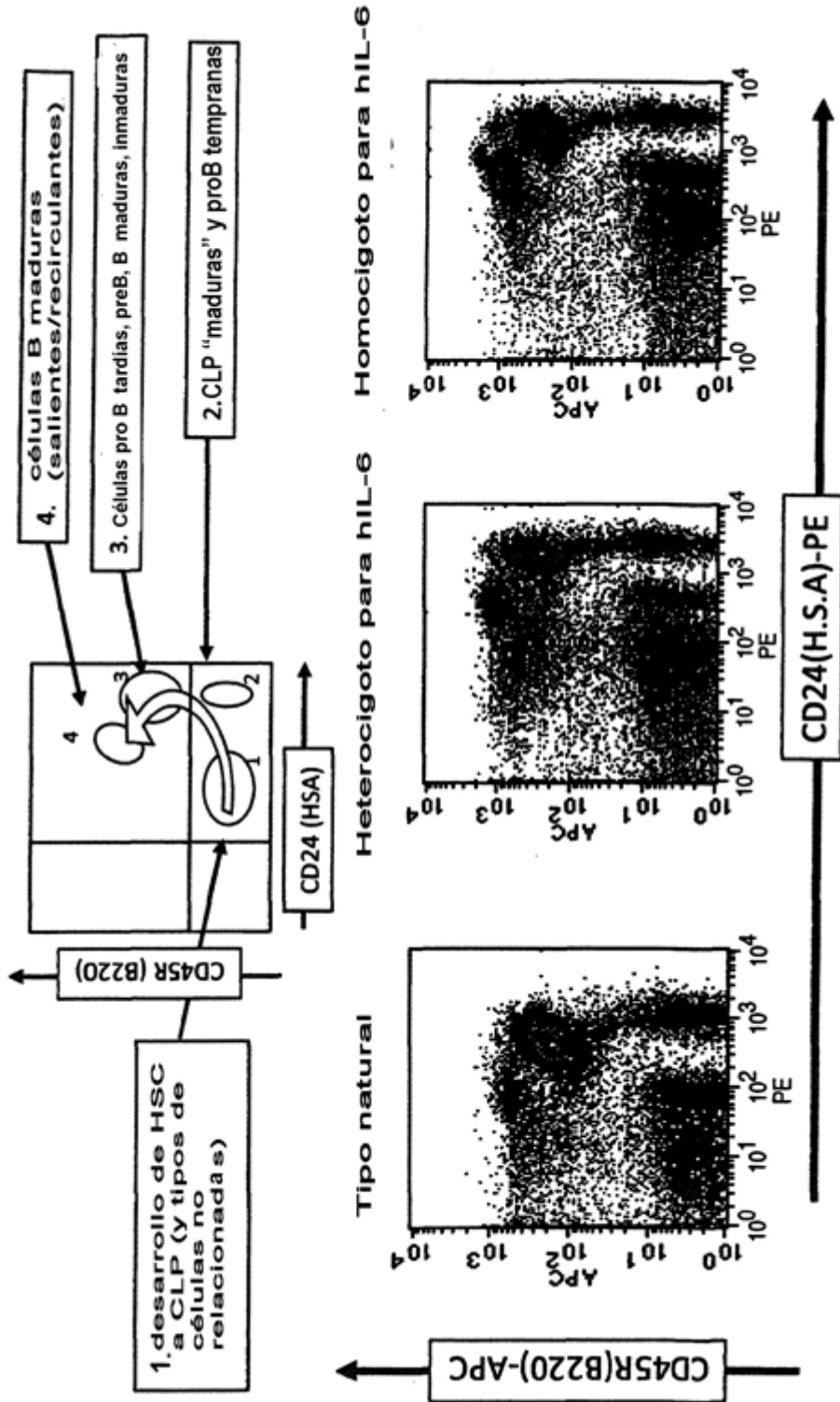


FIG. 14

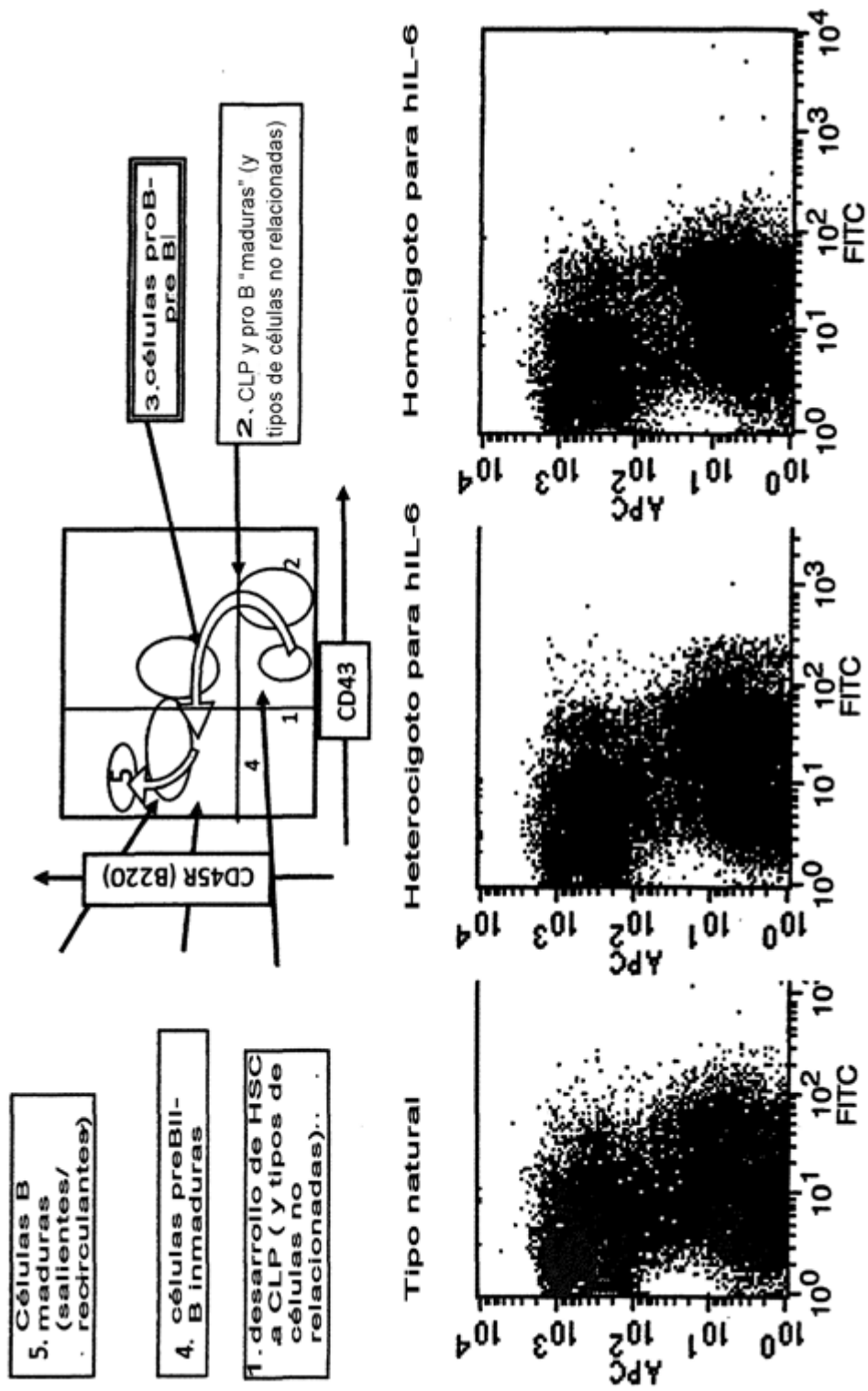


FIG. 15