

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 614**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2014 PCT/US2014/056910**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2015 WO15042557**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2014 E 14781783 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2922394**

54 Título: **Animales no humanos que tienen un gen humanizado de una proteína reguladora de señales**

30 Prioridad:

23.09.2013 US 201361881261 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MURPHY, ANDREW J.;
THURSTON, O. GAVIN;
VARGHESE, BINDU y
GURER, CAGAN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 624 614 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

Animales no humanos que tienen un gen humanizado de una proteína reguladora de señales

5 Descripción

Referencia cruzada con solicitud relacionada

10 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 61/881,261, presentada el 23 de septiembre de 2013.

Antecedentes de la invención

15 El sistema inmunitario se compone de varios tipos de células diferentes que están implicadas en múltiples procesos altamente regulados, y juntas generan respuestas inmunitarias que son eficaces en la eliminación de proteínas extrañas. Además, se ha encontrado que estas mismas células inmunitarias poseen una propiedad de autotolerancia, entre otras, para las proteínas reguladoras de membrana que regulan las interacciones de célula a célula. Este tipo de comunicación es fundamental para la supervivencia de tales organismos, ya que se sugiere que estas mismas proteínas son un determinante importante en el trasplante de injertos. Sin embargo, no existe un sistema in vivo para determinar los aspectos moleculares de las interacciones de célula a célula del sistema inmunitario humano y su regulación. Un sistema de este tipo proporciona una fuente para ensayos en las funciones relacionadas con el sistema inmunitario y hematopoyético humano in vivo, así como la identificación de nuevas terapias y vacunas.

25 Breve descripción de la invención

La presente invención se basa en el reconocimiento de que es conveniente diseñar animales no humanos que permitan un mejor injerto de células madre hematopoyéticas humanas. La presente invención se basa además en el reconocimiento de que los animales no humanos que tienen un gen de SIRP α humanizado y/o que expresan, contienen, o producen de cualquier otra manera una proteína SIRP α humana o humanizada son convenientes, por ejemplo para usar en el injerto de células madre hematopoyéticas humanas.

35 La invención proporciona un ratón cuyo genoma comprende un reemplazo de los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α de ratón en un locus endógeno de SIRP α de ratón con los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α humano para formar un gen de SIRP α humanizado, en donde dicho gen de SIRP α humanizado se une operativamente a un promotor de SIRP α de ratón en dicho locus endógeno de SIRP α de ratón, y expresa en dicho ratón una proteína SIRP α humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína SIRP α humana codificada por dicho gen de SIRP α humano y una porción intracelular de la proteína SIRP α de ratón codificada por dicho gen de SIRP α de ratón.

40 La invención proporciona además una célula o tejido aislados de ratón cuyo genoma comprende un reemplazo de los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α de ratón en un locus endógeno de SIRP α de ratón con los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α humano para formar un gen de SIRP α humanizado, en donde dicho gen de SIRP α humanizado se une operativamente a un promotor de SIRP α de ratón en dicho locus endógeno de SIRP α de ratón, y codifica una proteína SIRP α humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína SIRP α humana codificada por dicho gen de SIRP α humano y una porción intracelular de la proteína SIRP α de ratón codificada por dicho gen de SIRP α de ratón.

50 La invención proporciona adicionalmente un método para obtener un ratón, que comprende: (a) reemplazar los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α de ratón en un locus endógeno de SIRP α de ratón en una célula ES de ratón con los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α humano para formar un gen de SIRP α humanizado, en donde dicho gen de SIRP α humanizado se une operativamente a un promotor de SIRP α de ratón en dicho locus endógeno de SIRP α de ratón, y codifica una proteína SIRP α humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína SIRP α humana codificada por dicho gen de SIRP α humano y una porción intracelular de la proteína SIRP α de ratón codificada por dicho gen de SIRP α de ratón, para obtener de esta manera una célula ES modificada de ratón que comprende dicho gen de SIRP α humanizado; y (b) crear un ratón con el uso de la célula ES modificada obtenida en (a).

60 La invención proporciona además un método para proporcionar un ratón transgénico, en donde una o más células humanas se trasplantan a un ratón de acuerdo con la invención.

65 La invención proporciona además un método para medir la fagocitosis de un sustrato marcado por una o más células de ratón que comprende, (a) proporcionar una o más células de ratón cuyo genoma comprende un reemplazo de los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α de ratón en un locus endógeno de SIRP α de ratón con los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α humano para formar un gen de SIRP α humanizado, en donde dicho gen de SIRP α humanizado se une operativamente a un promotor de SIRP α de ratón en dicho locus endógeno de SIRP α de

ratón, y codifica una proteína SIRP α humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína SIRP α humana codificada por dicho gen de SIRP α humano y una porción intracelular de la proteína SIRP α de ratón codificada por dicho gen de SIRP α de ratón; (b) incubar una o más células de la etapa (a) con el sustrato marcado; y (c) medir la fagocitosis del sustrato marcado por una o más células de la etapa (b).

5 La invención proporciona además un método para medir la fagocitosis de un antígeno por una o más células de un ratón, que comprende (a) proporcionar un ratón de acuerdo con la invención; (b) exponer el ratón al antígeno; y (c) medir la fagocitosis del antígeno por una o más células del ratón.

10 La invención proporciona adicionalmente un método para evaluar la eficacia terapéutica de un fármaco para dirigirse a células humanas, que comprende: (a) proporcionar un ratón de acuerdo con la invención en el que se han trasplantado una o más células humanas; (b) administrar un candidato a fármaco a dicho ratón; y (c) controlar las células humanas en el ratón para determinar la eficacia terapéutica del candidato a fármaco.

15 En la presente descripción se describe un animal no humano que expresa un polipéptido de SIRP α que comprende una porción extracelular de una proteína SIRP α humana y una porción intracelular de una proteína SIRP α de ratón.

Una porción extracelular de una proteína SIRP α humana puede comprender aminoácidos correspondientes a los residuos 28-362 de una proteína SIRP α humana que aparece en la sec. con núm. de ident.: 4.

20 Una porción extracelular de una proteína SIRP α humana puede compartir un por ciento de identidad de al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % con una porción extracelular correspondiente de una proteína SIRP α humana que aparece en la Tabla 3. Una porción extracelular de una proteína SIRP α humana puede compartir el 100 % de identidad (o ser idéntica) con una porción extracelular correspondiente de una proteína SIRP α humana que aparece en la Tabla 3.

25 En la presente descripción se describe además un animal no humano que tampoco expresa una proteína SIRP α endógena no humana. El animal no humano puede ser un roedor que tampoco expresa una proteína SIRP α endógena de roedor. El animal no humano puede ser un ratón que tampoco expresa una proteína SIRP α endógena de ratón que tiene una secuencia que aparece en la Tabla 3.

30 En la presente descripción se describe además un animal no humano que comprende un gen de SIRP α que comprende los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α humano unido operativamente a un promotor de SIRP α no humano.

35 Un gen de SIRP α de un animal no humano descrito en el presente documento puede comprender los exones 1, 5, 6, 7 y 8 de un gen endógeno de SIRP α no humano.

40 Un animal no humano descrito en el presente documento puede ser un roedor. El roedor puede seleccionarse de un ratón o una rata.

45 En la presente descripción se describe además un polipéptido de SIRP α codificado por el gen de un animal no humano como se describe en el presente documento.

50 En la presente descripción se describe además una célula o tejido aislados a partir de un animal no humano como se describe en el presente documento. Una célula puede seleccionarse a partir de un linfocito (por ejemplo, una célula B o T), una célula mielóide (por ejemplo, un macrófago, un neutrófilo, un granulocito, una célula dendrítica mielóide, y un mastocito), y una neurona. Un tejido puede seleccionarse de tejido adiposo, vejiga, cerebro, mama, médula ósea, ojo, corazón, intestino, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, músculo, páncreas, plasma, suero, piel, bazo, estómago, timo, testículo, óvulo, y/o una combinación de estos.

55 En la presente descripción se describe adicionalmente una célula o tejido aislados de ratón cuyo genoma incluye un gen de SIRP α que codifica la porción extracelular de una proteína SIRP α humana unida a la porción intracelular de una proteína SIRP α de ratón. El gen de SIRP α descrito en el presente documento puede unirse operativamente a un promotor de SIRP α de ratón. Un gen de SIRP α descrito en el presente documento puede comprender los exones 2, 3, y 4 de un gen de SIRP α humano.

60 En la presente descripción se describe además una célula madre embrionaria (ES) no humana cuyo genoma comprende un gen de SIRP α como se describe en el presente documento. La célula ES puede comprender los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α humano unidos operativamente a un promotor de SIRP α no humano. La célula ES puede ser una célula ES de roedor. Una célula madre embrionaria no humana descrita en el presente documento puede ser una célula madre embrionaria de ratón o rata.

65 En la presente descripción se describe además un embrión no humano que comprende, se produce, se obtiene, o se genera a partir de una célula madre embrionaria no humana que comprende un gen de SIRP α como se describe en

el presente documento. El embrión no humano puede ser un embrión de roedor. El embrión de roedor como se describe en el presente documento puede ser un embrión de ratón o rata.

En la presente descripción se describe además un método para obtener un animal no humano que expresa una proteína SIRP α a partir de un locus endógeno de SIRP α , en donde la proteína SIRP α comprende una secuencia humana, el método comprende transformar un locus endógeno de SIRP α en una célula ES no humana con un fragmento genómico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína SIRP α humana en su totalidad o en parte; obtener una célula ES no humana modificada que comprende un locus endógeno de SIRP α que comprende dicha secuencia humana; y, crear un animal no humano mediante el uso de dicha célula ES modificada.

Como se describe en el presente documento, dicha secuencia de nucleótidos puede comprender los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α humano. Dicha secuencia de nucleótidos puede comprender los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α humano que tiene una secuencia al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % idéntica a un gen de SIRP α humano que aparece en la Tabla 3.

Dicha secuencia de nucleótidos puede codificar los residuos de aminoácidos 28-362 de una proteína SIRP α humana. Dicha secuencia de nucleótidos puede codificar los residuos de aminoácidos 28-362 de una proteína SIRP α humana que tiene una secuencia al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % idéntica a una proteína SIRP α humana que aparece en la Tabla 3.

En la presente descripción se describe adicionalmente un método para proporcionar un ratón cuyo genoma incluye un gen de SIRP α que codifica la porción extracelular de una proteína SIRP α humana unida a la porción intracelular de una proteína SIRP α de ratón, el método comprende modificar el genoma de un ratón de manera que éste comprenda un gen de SIRP α que codifique la porción extracelular de una proteína SIRP α humana unida a la porción intracelular de una proteína SIRP α de ratón para proporcionar de esta manera dicho ratón. El gen de SIRP α puede ser un gen de SIRP α como se describe en el presente documento. El gen de SIRP α puede comprender los exones 2, 3, y 4 de un gen de SIRP α humano.

En la presente descripción se describe además un método para injertar células humanas a un ratón, el método comprende etapas para proporcionar un ratón cuyo genoma comprende un gen de SIRP α que codifica la porción extracelular de una proteína SIRP α humana unida a la porción intracelular de una proteína SIRP α de ratón, y trasplantar una o más células humanas al ratón. El método puede comprender, además, como una etapa, ensayar el injerto de una o más células humanas en el ratón. La etapa de ensayar puede comprender comparar el injerto de una o más células humanas con el injerto en uno o más ratones de tipo silvestre. La etapa de ensayar puede comprender comparar el injerto de una o más células humanas con el injerto en uno o más ratones cuyo genoma no comprende un gen de SIRP α que codifica la porción extracelular de una proteína SIRP α humana unida a la porción intracelular de una proteína SIRP α de ratón.

Las células humanas pueden ser células madre hematopoyéticas. Las células humanas pueden trasplantarse por vía intravenosa. Las células humanas pueden trasplantarse por vía intraperitoneal. Las células humanas pueden trasplantarse por vía subcutánea.

En la presente descripción se describe además un método que comprende las etapas de proporcionar una o más células cuyo genoma incluye un gen de SIRP α que codifica la porción extracelular de una proteína SIRP α humana unida a la porción intracelular de una proteína SIRP α de ratón, incubar una o más células con un sustrato marcado, y medir la fagocitosis del sustrato marcado por una o más células. Las células pueden ser células de ratón.

El sustrato puede estar marcado fluorescentemente. El sustrato puede estar marcado con un anticuerpo. El sustrato puede ser uno o más glóbulos rojos. El sustrato puede ser una o más células bacterianas.

En la presente descripción se describe adicionalmente un método que comprende las etapas de proporcionar un ratón cuyo genoma incluye un gen de SIRP α que codifica la porción extracelular de una proteína SIRP α humana unida a la porción intracelular de una proteína SIRP α de ratón, exponer el ratón a un antígeno, y medir la fagocitosis del antígeno por una o más células del ratón. La etapa de exponer puede comprender exponer el ratón a un antígeno que está marcado fluorescentemente. La etapa de exponer puede comprender exponer el ratón a una o más células que comprenden el antígeno. La etapa de exponer puede comprender exponer el ratón a una o más células humanas que comprenden el antígeno. La etapa de exponer puede comprender exponer el ratón a una o más células bacterianas que comprenden el antígeno.

Un gen de SIRP α descrito en el presente documento comprende los exones 2, 3, y 4 de un gen de SIRP α humano. Una porción extracelular de una proteína SIRP α humana descrita en el presente documento puede comprender los aminoácidos correspondientes a los residuos 28-362 de una proteína SIRP α humana que aparece en la Tabla 3. Un gen de SIRP α descrito en el presente documento puede unirse operativamente a un promotor de SIRP α de ratón.

En la presente descripción se describe además un animal no humano que puede obtenerse por los métodos según se describen en el presente documento. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden no expresar de manera detectable una porción extracelular de una proteína SIRP α endógena.

5 En la presente descripción se describen además métodos para la identificación o validación de un fármaco o vacuna, el método comprende las etapas de suministrar un fármaco o vacuna a un animal no humano como se describe en el presente documento, y controlar una o más de las respuestas inmunitarias al fármaco o vacuna, el perfil de seguridad del fármaco o vacuna, o el efecto sobre una enfermedad o afección. El control del perfil de seguridad puede incluir la determinación de si el animal no humano exhibe un efecto secundario o reacción adversa como resultado del suministro del fármaco o vacuna. Un efecto secundario o reacción adversa puede seleccionarse de morbilidad, mortalidad, alteración del peso corporal, alteración del nivel de una o más enzimas (por ejemplo, hepáticas), alteración en el peso de uno o más órganos, pérdida de función (por ejemplo, sensorial, motora, de órganos, etcétera), aumento de la susceptibilidad a una o más enfermedades, alteraciones al genoma del animal no humano, aumento o disminución del consumo de alimentos y complicaciones de una o más enfermedades.

15 En la presente descripción se describe adicionalmente el uso de un animal no humano de la presente invención en el desarrollo de un fármaco o vacuna para su uso en medicina, tal como su uso como un medicamento.

20 En la presente descripción se describe además el uso de un animal no humano descrito en el presente documento para evaluar la eficacia de un fármaco terapéutico que se dirige a células humanas. Un animal no humano descrito en el presente documento puede trasplantarse con células humanas, y puede administrarse al animal un candidato a fármaco que se dirige a tales células humanas. La eficacia del fármaco se determina mediante el control de las células humanas en el animal no humano después de la administración del fármaco.

25 Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden ser roedores, preferentemente un ratón o una rata.

30 Como se usa en esta solicitud, los términos “alrededor de” y “aproximadamente” se usan como equivalentes. Cualquier número usado en esta solicitud con o sin alrededor de/aproximadamente pretende abarcar cualquiera de las fluctuaciones normales apreciadas por un experto en la técnica en cuestión.

35 Otras características, objetivos, y ventajas de la presente invención son evidentes en la descripción detallada a continuación. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada, si bien indica modalidades de la presente invención, se proporciona solamente a modo de ilustración, no de limitación. Diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

40 Las figuras incluidas en la presente descripción solamente tienen propósitos ilustrativos y no de limitación.

45 La Figura 1 muestra un diagrama, no a escala, de un gen murino endógeno de SIRP α (superior) con cada exón numerado. Se muestra un gen endógeno de SIRP α humanizado (inferior) que contiene los exones 2-4 de un gen de SIRP α humano y un casete de selección de neomicina (Ub-Neo) flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasas sitio específicas (por ejemplo, loxP). La inserción dirigida de los exones 2-4 de un gen de SIRP α humano da como resultado un gen endógeno que expresa un gen de SIRP α humanizado que tiene una región extracelular correspondiente a una proteína SIRP α humana.

50 La Figura 2 muestra una superposición de la expresión de SIRP α de ratones de tipo silvestre y heterocigotos para un gen de SIRP α humanizado.

La Figura 3 muestra el por ciento de células CD45+ en diferentes cepas de ratones injertados con células CD34+ humanas.

55 La Figura 4 muestra el por ciento de células CD45+CD3+ en diferentes cepas de ratones injertados con células CD34+ humanas.

La Figura 5 muestra el por ciento de células CD45+CD19+ en diferentes cepas de ratones injertados con células CD34+ humanas.

60 La Figura 6 muestra que Ac 1 suprimió el crecimiento de tumores Raji de manera dependiente de la dosis en ratones BRG SIRP α injertados con hCD34+. El volumen de los tumores Raji se midió en los días 3, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30 y 34 después de la implantación del tumor. Se presentan los datos de los animales individuales (Paneles A-D). Los ratones BRG SIRP α injertados con hCD34+ recibieron la administración de 2 x 10⁶ células tumorales Raji por vía subcutánea en el Día 0. Los grupos control no recibieron anticuerpo (control de vehículo) (Panel A). Para los grupos experimentales, en el Día 0 los ratones se trataron con una dosis IP de un Ac control de no unión (control Ac

5) a 0,4 mg/kg (Panel B), o Ac 1 a 0,4 mg/kg (Panel C) o 0,04 mg/kg (Panel D), seguido por dosis dos veces a la semana por la duración del estudio. Los datos compuestos para todos los grupos de prueba individuales se muestran en la Figura 7.

5 La Figura 7 muestra que el Ac 1 suprimió significativamente el crecimiento de tumores Raji en comparación con los controles en ratones BRG SIRP α injertados con hCD34+. Los datos representan los datos compuestos de n=4-5 ratones por grupo como se muestra en la Figura 6. Los datos se expresan como media (SEM) y se analizaron mediante el uso de análisis de varianza (ANOVA) y pruebas post hoc para determinar los efectos significativos (prueba de Tukey para el ANOVA de dos vías). Un ratón en el grupo control de vehículo, el grupo Control de Ac 5, y el grupo de Ac 1 a 0,4 mg/kg se excluyeron de este gráfico compuesto debido a una muerte temprana, para analizar los datos mediante ANOVA de dos vías.

15 La Figura 8 muestra que el Ac 1 no afectó el peso corporal en ratones BRG SIRP α injertados con hCD34+. Los pesos corporales se midieron en los días 3, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30 y 34 después de la implantación del tumor. Se midieron los datos para los animales individuales (Paneles A-D). Los ratones BRG SIRP α injertados con hCD34+ recibieron la administración de 2 x 10⁶ células tumorales Raji por vía subcutánea en el Día 0. Los grupos control no recibieron anticuerpo (control de vehículo) (Panel A). Para los grupos experimentales, en el Día 0 los ratones se trataron con un dosis IP del Control de no unión de IgG1 Ac 5 a 0,4 mg/kg (Panel B) o Ac 1 a 0,4 mg/kg (Panel C) o 0,04 mg/kg (Panel D), seguido por dosis dos veces a la semana durante todo el estudio.

20 Definiciones

25 Esta invención no se limita a los métodos particulares y condiciones experimentales descritos, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. Además, debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción es solamente para el propósito de describir modalidades particulares, y no pretende ser limitante, dado que el alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones.

30 A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos y frases usados en la presente descripción incluyen los significados que se atribuyen a los términos y frases en la técnica, a menos que se indique claramente lo contrario o resulte claramente evidente a partir del contexto en el cual se usa el término o frase. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación se describirán métodos y materiales particulares.

35 El término "aproximadamente", como se aplica en la presente descripción a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia indicado. En modalidades determinadas, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un intervalo de valores que caen dentro de 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, o menos en cualquier dirección (mayor o menor) del valor de referencia indicado a menos que se indique de cualquier otra manera o resulte evidente de cualquier otra manera a partir del contexto (excepto cuando tal número exceda el 100 % de un valor posible).

45 El término "biológicamente activo" como se usa en la presente descripción se refiere a una característica de cualquier agente que tenga actividad en un sistema biológico, in vitro o in vivo (por ejemplo, en un organismo). Por ejemplo, un agente que, cuando está presente en un organismo, tiene un efecto biológico dentro de ese organismo, se considera biológicamente activo. En modalidades particulares, cuando una proteína o polipéptido es biológicamente activo, una porción de esa proteína o polipéptido que comparte al menos una actividad biológica de la proteína o polipéptido se refiere típicamente como una porción "biológicamente activa".

50 El término "comparable", como se usa en la presente descripción, se refiere a dos o más agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etcétera, que pueden no ser idénticos entre sí pero que son suficientemente similares para permitir la comparación entre ellos de manera que puedan obtenerse conclusiones razonablemente en base a las diferencias o las similitudes observadas. Los expertos en la técnica entenderán, en el contexto, cuál es el grado de identidad requerido en cualquier circunstancia determinada para que dos o más de tales agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etcétera, se consideren comparables.

60 El término "conservador" como se usa en la presente descripción para describir una sustitución de aminoácidos conservadora, se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservadora no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de un receptor de unirse a un ligando. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen cadenas laterales alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; cadenas laterales hidroxialifáticas tales como serina y treonina; cadenas laterales que contienen grupo amida tales como asparagina y glutamina; cadenas laterales aromáticas tales como fenilalanina, tirosina, y triptófano; cadenas laterales básicas tales como lisina, arginina e histidina; cadenas laterales ácidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y, cadenas laterales que contienen azufre tales como

cisteína y metionina. Los grupos de sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/tirosina, lisina/arginina, alanina/valina, glutamato/aspartato, y asparagina/glutamina. En algunas modalidades, una sustitución de aminoácido conservadora puede ser una sustitución de cualquier residuo nativo en una proteína con alanina, como se usa, por ejemplo, en la mutagénesis por barrido de alanina. En algunas modalidades, se produce una sustitución conservadora que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en Gonnet y otros (1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45. En algunas modalidades, la sustitución es una sustitución moderadamente conservadora en donde la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

El término "interrupción" como se usa en la presente descripción se refiere al resultado de un evento de recombinación homóloga con una molécula de ADN (por ejemplo, con una secuencia homóloga endógena tal como un gen o locus génico). En algunas modalidades, una interrupción puede lograr o representar una inserción, una delección, una sustitución, un reemplazo, una mutación con pérdida de sentido, o un desplazamiento del marco de una(s) secuencia(s) de ADN, o cualquier combinación de estos. Las inserciones pueden incluir la inserción de genes completos o fragmentos de genes, por ejemplo, exones, que pueden ser de un origen distinto al de la secuencia endógena. En algunas modalidades, una interrupción puede aumentar la expresión y/o actividad de un gen o producto génico (por ejemplo, de una proteína codificada por un gen). En algunas modalidades, una interrupción puede disminuir la expresión y/o actividad de un gen o producto génico. En algunas modalidades, una interrupción puede alterar la secuencia de un gen o un producto génico codificado (por ejemplo, una proteína codificada). En algunas modalidades, una interrupción puede truncar o fragmentar un gen o un producto génico codificado (por ejemplo, una proteína codificada). En algunas modalidades, una interrupción puede extender un gen o un producto génico codificado; en algunas de tales modalidades, una interrupción puede lograr el ensamblaje de una proteína de fusión. En algunas modalidades, una interrupción puede afectar el nivel pero no la actividad de un gen o producto génico. En algunas modalidades, una interrupción puede afectar la actividad pero no el nivel de un gen o producto génico. En algunas modalidades, una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre el nivel de un gen o producto génico. En algunas modalidades, una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre la actividad de un gen o producto génico. En algunas modalidades, una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre el nivel o la actividad de un gen o producto génico.

La frase "locus endógeno" o "gen endógeno" como se usa en la presente descripción se refiere a un locus genético encontrado en un organismo parental o de referencia antes de la introducción de una interrupción, delección, reemplazo, alteración, o modificación como se describe en el presente documento. En algunas modalidades, el locus endógeno tiene una secuencia que se encuentra en la naturaleza. En algunas modalidades, el locus endógeno es un locus de tipo silvestre. En algunas modalidades, el organismo de referencia es un organismo de tipo silvestre. En algunas modalidades, el organismo de referencia es un organismo diseñado. En algunas modalidades, el organismo de referencia es un organismo criado en un laboratorio (ya sea de tipo silvestre o diseñado).

La frase "promotor endógeno" se refiere a un promotor que se asocia naturalmente, por ejemplo, en un organismo de tipo silvestre, con un gen endógeno.

El término "heterólogo" como se usa en la presente descripción se refiere a un agente o entidad de una fuente diferente. Por ejemplo, cuando se usa en referencia a un polipéptido, gen, o producto génico o presente en una célula u organismo particulares, el término aclara que el polipéptido, gen, o producto génico relevantes 1) se diseñó por el hombre; 2) se introdujo en la célula u organismo (o un precursor de este) por acción del hombre (por ejemplo, por medio de ingeniería genética); y/o 3) no se produce o no está presente de manera natural en la célula u organismo relevantes (por ejemplo, el tipo de célula o el tipo de organismo relevantes).

El término "célula huésped" como se usa en la presente descripción se refiere a una célula en la cual se ha introducido un ácido nucleico o una proteína heterólogos (por ejemplo, exógenos). Después de leer esta descripción los expertos entenderán que dicho término no se refiere solamente a la célula particular en cuestión, sino que se usa, además, para referirse a la progenie de una célula de este tipo. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en las generaciones posteriores ya sea debido a una mutación o a influencias del ambiente, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero aun así se incluye dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en la presente descripción. En algunas modalidades, una célula huésped es, o comprende, una célula procarionta o eucariota. En general, una célula huésped es cualquier célula que sea adecuada para recibir y/o producir un ácido nucleico o una proteína heterólogos, independientemente del reino de la vida al que pertenece la célula. Las células ilustrativas incluyen las de organismos procariontas y eucariotas (unicelulares o pluricelulares), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., etcétera), células de micobacterias, células fúngicas, células de levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etcétera), células vegetales, células de insectos (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insectos infectadas con baculovirus, *Trichoplusia ni*, etcétera), células de animales no humanos, células humanas, o fusiones de células tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. En algunas modalidades, la célula es una célula humana, de mono, simio, hámster, rata, o ratón. En algunas modalidades, la célula es eucariota y se selecciona de las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), célula de retina, Vero, CV1, renal (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38,

MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (por ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral, y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas modalidades, la célula comprende uno o más genes virales, por ejemplo, una célula de retina que expresa un gen viral (por ejemplo, una célula PER.C6™). En algunas modalidades, una célula huésped es, o comprende, una célula aislada. En algunas modalidades, una célula huésped es parte de un tejido. En algunas modalidades, una célula huésped es parte de un organismo.

El término "humanizado" se usa en la presente descripción de acuerdo con el significado que se entiende en la técnica para referirse a ácidos nucleicos o proteínas cuyas estructuras (es decir, secuencias de nucleótidos o aminoácidos) incluyen porciones que se corresponden sustancial o idénticamente con estructuras de un gen o proteína particulares que se encuentran en la naturaleza en un animal no humano, e incluyen, además, porciones que se diferencian de la encontrada en el gen o proteína no humanos particulares en cuestión y en lugar de eso se corresponden de manera más cercana con estructuras comparables que se encuentran en un gen o proteína humanos correspondientes. Un gen "humanizado" puede ser uno que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos sustancialmente igual a la de un polipéptido humano (por ejemplo, una proteína humana o porción de esta – por ejemplo, una porción característica de esta). Para dar un ejemplo, en el caso de un receptor de membrana, un gen "humanizado" puede codificar un polipéptido que tiene una porción extracelular que tiene una secuencia de aminoácidos igual a la de una porción extracelular humana y la secuencia restante igual a la de un polipéptido no humano (por ejemplo, de ratón). Un gen humanizado puede comprender al menos una porción de una secuencia de ADN de un gen humano. Un gen humanizado puede comprender una secuencia de ADN completa de un gen humano. Una proteína humanizada puede comprender una secuencia que tiene una porción que aparece en una proteína humana. Una proteína humanizada puede comprender una secuencia completa de una proteína humana y se expresa a partir de un locus endógeno de un animal no humano que corresponde al homólogo o al ortólogo del gen humano.

El término "identidad" como se usa en la presente descripción en relación con una comparación de secuencias, se refiere a la identidad determinada mediante una serie de algoritmos diferentes conocidos en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos. En algunas modalidades, las identidades como se describen en el presente documento se determinan con el uso de un alineamiento ClustalW v. 1,83 (lento) que emplea una penalización por apertura de interrupción de 10,0, una penalización por extensión de interrupción de 0,1, y el uso de una matriz de similitud de Gonnet (MACVECTOR™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008).

El término "aislado" como se usa en la presente descripción, se refiere a una sustancia y/o entidad que (1) se ha separado de al menos algunos de los componentes con los que se asociaba cuando se produjo inicialmente (ya sea naturalmente y/o en un entorno experimental), y/o (2) se ha diseñado, producido, preparado, y/o fabricado por la obra del hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o más de aproximadamente 99 % de los otros componentes con los que se asociaban inicialmente. En algunas modalidades, los agentes aislados son aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o más de aproximadamente 99 % puros. Como se usa en la presente descripción, una sustancia es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes. En algunas modalidades, como entenderán los expertos en la técnica, una sustancia aún puede considerarse "aislada" o incluso "pura", después de combinarse con otros componentes determinados tales como, por ejemplo, uno o más portadores o excipientes (por ejemplo, tampón, disolvente, agua, etcétera); en tales modalidades, el porcentaje de aislamiento o pureza de la sustancia se calcula sin incluir tales portadores o excipientes. Solo para dar un ejemplo, en algunas modalidades, un polímero biológico tal como un polipéptido o un polinucleótido que se produce en la naturaleza se considera "aislado" cuando: a) en virtud de su origen o fuente de obtención no se asocia con algunos o todos los componentes que lo acompañan en su estado nativo en la naturaleza; b) está sustancialmente libre de otros polipéptidos o ácidos nucleicos de la misma especie de la especie que lo produce en la naturaleza; o c) se expresa por, o se encuentra de cualquier otra manera en asociación con componentes de una célula u otro sistema de expresión que no es de la especie que lo produce en la naturaleza. Así, por ejemplo, en algunas modalidades, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente al que lo produce en la naturaleza se considera un polipéptido "aislado". Alternativamente o adicionalmente, en algunas modalidades, un polipéptido que se ha sometido a una o más técnicas de purificación puede considerarse un polipéptido "aislado" en la medida que se ha separado de otros componentes a) con los que se asocia en la naturaleza; y/o b) con los que se asociaba cuando se produjo inicialmente.

La frase "animal no humano" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier organismo vertebrado que no es un ser humano. En algunas modalidades, un animal no humano es un ciclóstomo, un pez óseo, un pez cartilaginoso (por ejemplo, un tiburón o una raya), un anfibio, un reptil, un mamífero, y un ave. En algunas

modalidades, un mamífero no humano es un primate, una cabra, una oveja, un cerdo, un perro, una vaca, o un roedor. En algunas modalidades, el animal no humano es un roedor tal como una rata o un ratón.

5 La frase "ácido nucleico", como se usa en la presente descripción, en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que sea una cadena oligonucleotídica, o que puede incorporarse a esta. En algunas modalidades, un ácido nucleico es un compuesto y/o sustancia que sea una cadena oligonucleotídica, o pueda incorporarse a esta, por medio de un enlace fosfodiéster. Como resultará evidente a partir del contexto, en algunas modalidades, "ácido nucleico" se refiere a residuos de ácidos nucleicos individuales (por ejemplo, nucleótidos y/o nucleósidos); en algunas modalidades, "ácido nucleico" se refiere a una cadena oligonucleotídica que comprende 10 residuos de ácidos nucleicos individuales. En algunas modalidades, un "ácido nucleico" es o comprende ARN; en algunas modalidades, un "ácido nucleico" es o comprende ADN. En algunas modalidades, un ácido nucleico es, comprende, o consiste en uno o más residuos de ácidos nucleicos naturales. En algunas modalidades, un ácido nucleico es, comprende, o consiste en uno o más análogos de ácidos nucleicos. En algunas modalidades, un análogo de ácido nucleico se diferencia de un ácido nucleico en que no utiliza una cadena principal con enlaces fosfodiéster. Por ejemplo, en algunas modalidades, un ácido nucleico es, comprende, o consiste en uno o más "ácidos nucleicos peptídicos", que se conocen en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en la cadena principal, y se consideran dentro del alcance de la presente invención. Alternativamente o 15 adicionalmente, en algunas modalidades, un ácido nucleico tiene uno o más enlaces fosforotioato y/o 5'-N-fosforamida en lugar de enlaces fosfodiéster. En algunas modalidades, un ácido nucleico es, comprende, o consiste en uno o más nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina, y desoxicitidina). En algunas modalidades, un ácido nucleico es, comprende, o consiste en uno o más análogos de nucleósidos (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolopirimidina, 3-metiladenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinilcitidina, C-5 propiniluridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propiniluridina, C5-propinilcitidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina, 2-tiocitidina, bases metiladas, bases intercaladas, y combinaciones de estos). En algunas modalidades, un ácido nucleico comprende uno o más azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa, y hexosa) en comparación con los que se encuentran en los ácidos nucleicos naturales. En algunas modalidades, un ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico funcional tal como un ARN o una proteína. En algunas modalidades, un ácido nucleico incluye uno o más intrones. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos se preparan mediante uno o más de lo siguiente: aislamiento a partir de una fuente natural, síntesis enzimática por polimerización basada en un molde complementario (in vivo o in vitro), reproducción en una célula o sistema recombinantes, y síntesis química. En algunas modalidades, un ácido nucleico es de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 o más residuos de longitud. En algunas modalidades, un ácido nucleico es monocatenario; en algunas modalidades, un ácido nucleico es bicatenario. En algunas modalidades, un ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un elemento que codifica un polipéptido, o es el complemento de una secuencia que codifica un polipéptido. En algunas modalidades, un ácido nucleico tiene actividad enzimática. 40

La frase "unido operativamente", como se usa en la presente descripción, se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Una secuencia de control "unida operativamente" a una secuencia codificante se une de manera tal que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias "unidas operativamente" incluyen las secuencias de control de la expresión contiguas al gen de interés y las secuencias de control de la expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de la expresión" como se usa en la presente descripción se refiere a secuencias de polinucleótidos, que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que se unen. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias adecuadas de iniciación, de terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción; señales para el procesamiento eficiente del ARN tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de las proteínas; y cuando convenga, secuencias que mejoran la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control se diferencia en dependencia del organismo huésped. Por ejemplo, en procariontes, tales secuencias de control generalmente incluyen promotor, sitio de unión al ribosoma, y secuencia de terminación de la transcripción, mientras que en eucariotes, típicamente, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" se destina a incluir componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y puede incluir, además, componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de pareja de fusión. 50 55 60

El término "polipéptido", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. En algunas modalidades, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que se produce en la naturaleza. En algunas modalidades, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que no se produce en la naturaleza. En algunas modalidades, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos diseñada por ingeniería genética debido a que se diseña y/o se produce a través de la acción del hombre. 65

El término "recombinante", como se usa en la presente descripción, está destinado a referirse a polipéptidos (por ejemplo, proteínas reguladoras de señales como se describe en el presente documento) que se diseñan, modifican por ingeniería genética, se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como polipéptidos expresados mediante el uso de un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, polipéptidos aislados a partir de una librería combinatoria de polipéptidos humanos recombinantes (Hoogenboom H. R., (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., e Highsmith W. E., (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J. V., y Larrick J. W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H., y Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378), anticuerpos aislados a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (ver por ejemplo, Taylor, L. D., y otros (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., y Green L. L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. y otros (2000) Immunology Today 21:364-370) o polipéptidos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de elementos de secuencia seleccionados entre sí. En algunas modalidades, uno o más de tales elementos de secuencia seleccionados se encuentran en la naturaleza. En algunas modalidades, uno o más de tales elementos de secuencia seleccionados se diseñan *in silico*. En algunas modalidades, uno o más de tales elementos de secuencia seleccionados son el resultado de la mutagénesis (por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*) de un elemento de secuencia conocido, por ejemplo, a partir de una fuente natural o sintética. Por ejemplo, en algunas modalidades, un polipéptido recombinante se compone de secuencias que se encuentran en el genoma de un organismo fuente de interés (por ejemplo, ser humano, ratón, etcétera). En algunas modalidades, un polipéptido recombinante tiene una secuencia de aminoácidos que es el resultado de la mutagénesis (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, en un animal no humano), de manera que las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos recombinantes son secuencias que, aunque se originan de secuencias de polipéptidos y se relacionan con estas, pueden no existir naturalmente dentro del genoma de un animal no humano *in vivo*.

El término "reemplazo" se usa en la presente descripción para referirse a un proceso a través del cual una secuencia de ácido nucleico "reemplazada" (por ejemplo, un gen) que se encuentra en un locus huésped (por ejemplo, en un genoma) se elimina de ese locus, y un ácido nucleico diferente, de "reemplazo" se coloca en su lugar. En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico reemplazada y las secuencias de ácidos nucleicos de reemplazo son comparables entre sí porque, por ejemplo, son homólogas entre sí y/o contienen elementos correspondientes (por ejemplo, elementos que codifican proteínas, elementos reguladores, etcétera). En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico reemplazada incluye uno o más de un promotor, un potenciador, un sitio donante de corte y empalme, un sitio receptor de corte y empalme, un intrón, un exón, una región no traducida (UTR); en algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de reemplazo incluye una o más secuencias codificantes. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de reemplazo es un homólogo de la secuencia de ácido nucleico reemplazada. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de reemplazo es un ortólogo de la secuencia reemplazada. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de reemplazo es, o comprende, una secuencia de ácido nucleico humana. En algunas modalidades, que incluyen cuando la secuencia de ácido nucleico de reemplazo es, o comprende, una secuencia de ácido nucleico humana, la secuencia de ácido nucleico reemplazada es, o comprende, una secuencia de roedor (por ejemplo, una secuencia de ratón). La secuencia de ácido nucleico así colocada puede incluir una o más secuencias reguladoras que son parte de la secuencia de ácido nucleico fuente usada para obtener la secuencia así colocada (por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones 5' o 3' no traducidas, etcétera). Por ejemplo, en diversas modalidades, el reemplazo es una sustitución de una secuencia endógena con una secuencia heteróloga que da como resultado la producción de un producto génico a partir de la secuencia de ácido nucleico así colocada (que comprende la secuencia heteróloga), pero no la expresión de la secuencia endógena; el reemplazo es de una secuencia genómica endógena con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene una función similar a la de la proteína codificada por la secuencia endógena (por ejemplo, la secuencia genómica endógena codifica una proteína SIRP α , y el fragmento de ADN codifica una o más proteínas SIRP α humanas). En diversas modalidades, un gen endógeno o un fragmento de este se reemplaza con un gen humano correspondiente o un fragmento de este. Un gen humano correspondiente o un fragmento de este es un gen humano o un fragmento que es un ortólogo, o es sustancialmente similar o igual en estructura y/o función, con el gen endógeno o fragmento de este que se reemplaza.

La frase "proteína reguladora de señales" o "SIRP" como se usa en la presente descripción se refiere a un receptor proteico regulador de señales, por ejemplo, un receptor de SIRP α . Los genes de SIRP incluyen un receptor de la membrana plasmática que se expresa en la superficie de una célula y sirve como una proteína reguladora implicada en las interacciones entre las proteínas de la superficie de la membrana en los leucocitos. Dentro de los genes de SIRP, se han descrito variantes polimórficas en sujetos humanos. A modo de ilustración, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los genes de SIRP de ratón y humano se proporcionan en la Tabla 1. Después de leer esta descripción los expertos reconocerán que uno o más genes de receptores SIRP endógenos en un genoma (o todos) pueden reemplazarse con uno o más genes de SIRP heterólogos (por ejemplo, variantes polimórficas, subtipos o mutantes, genes de otras especies, formas humanizadas, etcétera).

Una "célula que expresa SIRP" como se usa en la presente descripción se refiere a una célula que expresa un receptor proteico regulador de señales. En algunas modalidades, una célula que expresa SIRP expresa un receptor proteico regulador de señales en su superficie. En algunas modalidades, una proteína SIRP se expresa en la superficie de la célula en una cantidad suficiente para mediar las interacciones célula a célula por medio de la

proteína SIRP expresada en la superficie de la célula. Las células que expresan SIRP ilustrativas incluyen neuronas, linfocitos, células mieloides, macrófagos, neutrófilos, y células asesinas naturales (NK). Las células que expresan SIRP regulan la interacción de las células inmunitarias para regular la respuesta inmunitaria a diversos antígenos o patógenos extraños. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden demostrar una regulación de las células inmunitarias por medio de receptores SIRP humanizados expresados en la superficie de una o más células del animal no humano.

El término "sustancialmente" como se usa en la presente descripción se refiere a la condición cualitativa de exhibir una medida o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en las técnicas biológicas entenderá que los fenómenos biológicos y químicos pocas veces, si alguna vez lo hacen, llegan a su terminación y/o proceden hasta la totalidad o logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "sustancialmente" se usa en la presente descripción para capturar la carencia potencial de totalidad inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos.

La frase "homología sustancial" como se usa en la presente descripción se refiere a una comparación entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la técnica, generalmente dos secuencias se consideran "sustancialmente homólogas" si contienen residuos homólogos en las posiciones correspondientes. Los residuos homólogos pueden ser residuos idénticos. Alternativamente, los residuos homólogos pueden ser residuos no idénticos pero con características estructurales y/o funcionales adecuadamente similares. Por ejemplo, como bien conocen los expertos en la técnica, determinados aminoácidos se clasifican típicamente como aminoácidos "hidrofóbicos" o "hidrofílicos", y/o con cadenas laterales "polares" o "no polares". La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo puede considerarse frecuentemente una sustitución "homóloga". Las clasificaciones de aminoácidos típicas se resumen en la Tabla 1 y 2.

Tabla 1

Alanina	Ala	A	no polar	neutro	1,8
Arginina	Arg	R	polar	positivo	-4,5
Asparagina	Asn	N	polar	neutro	-3,5
Ácido aspártico	Asp	D	polar	negativo	-3,5
Cisteína	Cys	C	no polar	neutro	2,5
Ácido glutámico	Glu	E	polar	negativo	-3,5
Glutamina	Gln	Q	polar	neutro	-3,5
Glicina	Gly	G	no polar	neutro	-0,4
Histidina	His	H	polar	positivo	-3,2
Isoleucina	Ile	I	no polar	neutro	4,5
Leucina	Leu	L	no polar	neutro	3,8
Lisina	Lys	K	polar	positivo	-3,9
Metionina	Met	M	no polar	neutro	1,9
Fenilalanina	Phe	F	no polar	neutro	2,8
Prolina	Pro	P	no polar	neutro	-1,6
Serina	Ser	S	polar	neutro	-0,8
Treonina	Thr	T	polar	neutro	-0,7
Triptófano	Trp	W	no polar	neutro	-0,9
Tirosina	Tyr	Y	polar	neutro	-1,3
Valina	Val	V	no polar	neutro	4,2

Tabla 2

Aminoácidos ambiguos	3 Letras	1 Letra
Asparagina o ácido aspártico	Asx	B
Glutamina o ácido glutámico	Glx	Z
Leucina o Isoleucina	Xle	J
Aminoácido no especificado o desconocido	Xaa	X

Como bien se conoce en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos pueden compararse con el uso de cualquiera de una variedad de algoritmos, que incluyen los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, Gapped BLAST, y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Programas ilustrativos de este tipo se describen en Altschul, y otros, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, y otros, Methods in Enzymology; Altschul, y otros, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, y otros, Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, y otros, (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias homólogas, los programas mencionados anteriormente proporcionan típicamente una indicación del grado de homología. En algunas modalidades, dos secuencias se consideran sustancialmente homólogas si al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85

%, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus residuos correspondientes son homólogos en un tramo de residuos en cuestión. En algunas modalidades, el tramo en cuestión es una secuencia completa. En algunas modalidades, el tramo en cuestión es de al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o más residuos. En algunas modalidades, el tramo en cuestión incluye residuos contiguos a lo largo de una secuencia completa. En algunas modalidades, el tramo en cuestión incluye residuos discontinuos a lo largo de una secuencia completa. En algunas modalidades, el tramo en cuestión es de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más residuos.

La frase "identidad sustancial" como se usa en la presente descripción se refiere a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la técnica, generalmente, dos secuencias se consideran "sustancialmente idénticas" si contienen residuos idénticos en las posiciones correspondientes. Como bien se conoce en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos pueden compararse con el uso de cualquiera de una variedad de algoritmos, que incluyen los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, Gapped BLAST, y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Programas ilustrativos de este tipo se describen en Altschul, y otros, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, y otros, *Methods in Enzymology*; Altschul y otros, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997; Baxevanis y otros, *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; y Misener, y otros, (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132)*, Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente proporcionan típicamente una indicación del grado de identidad. En algunas modalidades, dos secuencias se consideran sustancialmente idénticas si al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus residuos correspondientes son idénticos en un tramo de residuos en cuestión. En algunas modalidades, el tramo en cuestión es una secuencia completa. En algunas modalidades, el tramo en cuestión es de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más residuos.

La frase "vector de transformación" o "construcción de transformación" como se usa en la presente descripción se refiere a una molécula polinucleotídica que comprende una región de transformación. Una región de transformación comprende una secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia en una célula, tejido o animal objetivo y proporciona la integración de la construcción de transformación en una posición dentro del genoma de la célula, tejido o animal por medio de recombinación homóloga. Se incluyen, además, las regiones de transformación que se dirigen hacia el objetivo con el uso de sitios de reconocimiento de recombinasas sitio específicas (por ejemplo, sitios loxP o Frt). En algunas modalidades, una construcción de transformación de la presente invención comprende, además, una secuencia de ácido nucleico o gen de interés particular, un marcador de selección, secuencias de control y/o reguladoras, y otras secuencias de ácidos nucleicos que permiten la recombinación mediada por la adición exógena de proteínas que ayudan o facilitan la recombinación que involucra a dichas secuencias. En algunas modalidades, una construcción de transformación de la presente invención comprende, además, un gen de interés en su totalidad o en parte, en donde el gen de interés es un gen heterólogo que codifica una proteína, en su totalidad o en parte, que tiene una función similar a la de una proteína codificada por una secuencia endógena.

El término "variante" como se usa en la presente descripción se refiere a una entidad que muestra una identidad estructural significativa con una entidad de referencia, pero se diferencia estructuralmente de la entidad de referencia en la presencia o el nivel de una o más porciones químicas en comparación con la entidad de referencia. En muchas modalidades, una variante se diferencia, además, funcionalmente de su entidad de referencia. En general, el hecho de que una entidad particular se considere adecuadamente como una "variante" de una entidad de referencia se basa en su grado de identidad estructural con la entidad de referencia. Como apreciarán los expertos en la técnica, cualquier entidad de referencia biológica o química tiene determinados elementos estructurales característicos. Una variante, por definición, es una entidad química definida que comparte uno o más de tales elementos estructurales característicos. Para proporcionar solo algunos ejemplos, una molécula pequeña puede tener un elemento estructural central característico (por ejemplo, un macrociclo central) y/o una o más porciones colgantes características de manera que una variante de la molécula pequeña es una que comparte el elemento estructural central y las porciones colgantes características pero se diferencia en otras porciones colgantes y/o en los tipos de enlaces presentes (simples vs. dobles, E vs. Z, etcétera) dentro del núcleo central, un polipéptido puede tener un elemento de secuencia característico que se compone de una pluralidad de aminoácidos que tienen posiciones designadas unas con respecto a las otras en el espacio lineal o tridimensional y/o que contribuyen a una función biológica particular, un ácido nucleico puede tener un elemento de secuencia característico que se compone de una pluralidad de residuos de nucleótidos que tienen posiciones designadas unos con respecto a otros en el espacio lineal o tridimensional. Por ejemplo, una variante de polipéptido puede diferenciarse de un polipéptido de referencia como resultado de una o más diferencias en la secuencia de aminoácidos y/o una o más diferencias en las porciones químicas (por ejemplo, carbohidratos, lípidos, etcétera) unidas covalentemente a la cadena principal del polipéptido. En algunas modalidades, una variante de polipéptido muestra una identidad de secuencia general con un polipéptido de referencia que es al menos de 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, o 99 %. Alternativamente o adicionalmente, en algunas modalidades, una variante de polipéptido no comparte al menos un elemento de secuencia característico con un polipéptido de referencia. En algunas modalidades, el polipéptido de referencia tiene una o más actividades biológicas. En algunas modalidades, una

variante de polipéptido comparte una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. En algunas modalidades, una variante de polipéptido carece de una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. En algunas modalidades, una variante de polipéptido muestra un nivel reducido de una o más actividades biológicas en comparación con el polipéptido de referencia. En muchas modalidades, un polipéptido de interés se considera una "variante" de un polipéptido original o de referencia si el polipéptido de interés tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la del original excepto por un pequeño número de alteraciones de la secuencia en posiciones particulares. Típicamente, menos de 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % de los residuos en la variante se sustituyen en comparación con el parental. En algunas modalidades, una variante tiene 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 residuo sustituido en comparación con un original. Frecuentemente, una variante tiene un número muy pequeño (por ejemplo, menos de 5, 4, 3, 2 o 1) de residuos funcionales sustituidos (es decir, residuos que participan en una actividad biológica particular). Además, típicamente, una variante no tiene más de 5, 4, 3, 2 o 1 adiciones o deleciones, y frecuentemente no tiene adiciones o deleciones, en comparación con el original. Por otra parte, cualquiera de las adiciones o deleciones son típicamente menores que aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 19, aproximadamente 18, aproximadamente 17, aproximadamente 16, aproximadamente 15, aproximadamente 14, aproximadamente 13, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, y comúnmente son menores que aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3, o aproximadamente 2 residuos. En algunas modalidades, el polipéptido parental o de referencia es uno que se encuentra en la naturaleza. Como entenderán los expertos en la técnica, una pluralidad de variantes de un polipéptido de interés particular puede encontrarse comúnmente en la naturaleza, particularmente cuando el polipéptido de interés es un polipéptido de un agente infeccioso.

El término "vector" como se usa en la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se asocia. En algunas modalidades, los vectores son capaces de replicar de manera extracromosómica y/o expresar los ácidos nucleicos a los que se encuentran unidos en una célula huésped tal como una célula eucariota y/o procariota. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes unidos operativamente se refieren en la presente descripción como "vectores de expresión."

El término "de tipo silvestre" como se usa en la presente descripción, tiene el significado que se entiende en la técnica que se refiere a una entidad que tiene una estructura y/o actividad como la que se encuentra en la naturaleza en un estado o contexto "normal" (a diferencia del mutante, enfermo, alterado, etcétera). Los expertos en la técnica apreciarán que los genes y polipéptidos de tipo silvestre existen frecuentemente en múltiples formas diferentes (por ejemplo, alelos).

Descripción detallada de la invención

En la presente descripción se describen, entre otras cosas, animales no humanos mejorados y/o modificados genéticamente que tienen material genético humanizado que codifica una proteína reguladora de señales (por ejemplo, SIRP) para ensayos de trasplante de injertos, activación de la fagocitosis y transducción de señales. Se contempla que tales animales no humanos proporcionan un mejoramiento en el trasplante de injertos de células humanas. Por lo tanto, la presente descripción es particularmente útil para mantener células hematopoyéticas humanas en animales no humanos. Particularmente, la presente descripción abarca la humanización de un gen de SIRP α de roedor que da lugar a la expresión de una proteína humanizada en la superficie de la membrana plasmática de células del animal no humano. Tales proteínas humanizadas tienen la capacidad de reconocer células humanas injertadas por medio de la participación de las proteínas SIRP α humanizadas y los ligandos presentes en la superficie de las células humanas injertadas. En la presente descripción se describe que los animales no humanos son capaces de recibir células hematopoyéticas humanas trasplantadas; tales mamíferos no humanos pueden desarrollar y/o tener un sistema inmunitario que comprende células humanas. Las proteínas SIRP α humanizadas pueden tener una secuencia correspondiente a los residuos de aminoácidos 28 - 362 de una proteína SIRP α humana. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden comprender un gen de SIRP α endógeno que contiene material genético del animal no humano y una especie heteróloga (por ejemplo, un ser humano). Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden comprender un gen de SIRP α humanizado, en donde el gen de SIRP α humanizado comprende los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α humano.

Diversos aspectos de la invención se describen en detalle en las siguientes secciones. El uso de secciones no significa que limite la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique de cualquier otra manera.

Familia de genes de la proteína reguladora de señales (SIRP)

Las proteínas reguladoras de señales (SIRP) constituyen una familia de glicoproteínas de la superficie celular que se expresan en linfocitos, células mieloides (que incluyen macrófagos, neutrófilos, granulocitos, células dendríticas mieloides, y mastocitos) y neuronas (por ejemplo, ver Barclay y Brown, 2006, Nat Rev Immunol 6, 457-464). Se ha informado de numerosos genes de SIRP y éstos pueden categorizarse por sus ligandos respectivos y los tipos de señalización donde están implicados. SIRP α (referido además como CD172A, SHPS1, P84, MYD-1, BIT y PTPNS1) se expresa en células inmunitarias del linaje mieloides y funciona como un receptor inhibitorio por medio de un motivo inhibidor basado en tirosina del inmunorreceptor (ITIM). La expresión de SIRP α se ha observado además en

neuronas. Los ligandos informados para SIRP α incluyen, más notablemente, CD47, pero además incluyen las proteínas tensoactivas A y D. SIRP β (referido además como CD172b) se expresa en macrófagos y neutrófilos, sin embargo, no se han informado ligandos conocidos. SIRP β contiene una región citoplasmática corta en comparación con SIRP α y se conoce que se asocia con un componente de señalización conocido como proteína 12 de activación de DNAX (DAP12). Así, SIRP β parece ser un receptor de activación. SIRP γ (referido además como CD172g y SIRP β 2) se expresa en linfocitos y células asesinas naturales y además se une a CD47, sin embargo, no se ha informado una función de señalización ya que la cola citoplasmática solo contiene cuatro aminoácidos y carece de una secuencia que pudiera facilitar la asociación con DAP12. Otro miembro, SIRP δ , se ha descrito y existe como un receptor soluble.

El papel de SIRP α , en particular, se ha investigado con respecto a su papel inhibitor en la fagocitosis de células huésped por macrófagos. Por ejemplo, la unión de CD47 a SIRP α en los macrófagos, activa señales inhibitoras que regulan negativamente la fagocitosis. Alternativamente, se han informado efectos de señalización positiva mediados a través de la unión a SIRP α (Shultz y otros, 1995, J Immunol 154, 180-91).

Secuencias de SIRP α

En la Tabla 3 se exponen secuencias ilustrativas de SIRP α para humano y ratón. Para las secuencias de ADNc, los exones consecutivos están separados por texto subrayado alternante. Para las secuencias de proteínas, los péptidos señal están subrayados y las secuencias transmembrana y citoplasmática están en letras cursivas.

Tabla 3

5	ADNc de SIRP α de ratón NM_007547.3	<p>GCGCTCGGCCGGGCCGCCCTCGCGCTGGCCTCGCGACGGCTC CGCACAGCCCGCACTCGCTCTGCGAGCTGTCCCCGCTCGCGCT TGCTCTCCGATCTCCGTCCCCGCTCCCTCTCCCTCTTCTCTCC CCCTCTTCTCTCTCCCTCGCTATCCGCTCCCCCGCCCCCGTGC</p>
10		<p>CTCTGGCTCTGCGCCTGGCTCCCTCGGGTCCGCTCCCCCTTTCC GCCGGCCTGGCCCCGGCGTCACGCTCCCGGAGTCTCCCCGCTCG GCGGGCTTCATTGTGGGAGGGGGTCAGATCACCCCGCCGGG CGGTGGCGCTGGGGGGCAGCGGAGGGGGAGGGCCTTAGTC GTTTCGCCCGCGCCGCCCGCCGCTGCCGAGCGCGCTCACCGC</p>
15		<p>CGCTCTCCCTCCTTGCTCTGCAGCCGCGGCCCATGGAGCCCGC CGGCCCGGCCCTGGCCGCTAGGGCCGCTGCTGCTCTGCCTG CTGCTCTCCGCTCCTGTTTCTGTACAGGAGCCACGGGGAAGG <u>AACTGAAGGTGACTCAGCCTGAGAAATCAGTGTCTGTTGCTG</u></p>
20		<p><u>CTGGGGATTCGACCGTTCTGAACTGCACTTTGACCTCCTTGTT</u> <u>GCCGGTGGGACCCATTAGGTGGTACAGAGGAGTAGGGCCAAG</u> <u>CCGGCTGTTGATCTACAGTTTCGCAGGAGAATACGTTCCCTCGA</u> <u>ATTAGAAATGTTTCAGATACTACTAAGAGAAACAATATGGAC</u></p>
25		<p><u>TTTTCCATCCGTATCAGTAATGTCACCCACAGATGCTGGCA</u> <u>TCTACTACTGTGTGAAGTTCAGAAAGGATCATCAGAGCC</u> <u>ACACAGAAATACAATCTGGAGGGGGAACAGAGGTCTATGTAC</u> <u>TCGCCAAACCTTCTCCACCGGAGGTATCCGGCCAGCAGACA</u></p>
30		<p><u>GGGGCATACTGACCAGAAAGTGAACCTCACCTGCAAGTCTC</u> <u>ATGGCTTCTCTCCCCGGAATATCACCTGAAGTGGTTCAAAGA</u> <u>TGGGCAAGAACTCCACCCCTTGGAGACCACCGTGAACCTAG</u> <u>TGGAAAGAATGTCTCCTACAACATCTCCAGCACAGTCAGGGT</u></p>
35		<p><u>GGTACTAAACTCCATGGATGTTAATTCTAAGGTCATCTGCGAG</u> <u>GTAGCCACATCACCTTGGATAGAAGCCCTCTTCGTGGGATTG</u> <u>CTAACCTGTCTAACTTCATCCGAGTTTCACCCACCGTGAAGGT</u> <u>CACCCAACAGTCCCCGACGTCAATGAACCAGGTGAACCTCAC</u></p>
40		<p><u>CTGCCGGGCTGAGAGGTTCTACCCCGAGGATCCACGCTGATC</u> <u>TGGCTGGAGAATGGAAACGTATCACGGAATGACAGCCCAAG</u> <u>AATCTCACAAGAACACGGATGGGACCTATAATTACACAAGC</u> <u>TTGTTCTGGTGAACCTCATCTGCTCATAGAGAGGACGTGGTGT</u></p>
45		<p><u>TCACGTGCCAGGTGAAGCACGACCAACAGCCAGCGATCACCC</u> <u>GAAACCATACCGTGTGGGATTTGCCCACTCGAGTGATCAAG</u> <u>GGAGCATGCAAACCTTCCCTGATAATAATGCTACCCACAAC</u> <u>GGAATGTCTTCATCGGTGTGGGCGTGGCGTGTGCTTTGCTCGT</u></p>
50		<p><u>AGTCCTGTGATGGCTGCTCTCTACCTCCTCCGGATCAAACAG</u> <u>AAGAAAGCCAAGGGGTCAACATCTTCCACACGGTTGCACGAG</u> <u>CCCGAGAAGAACGCCAGGGAAATAACCCAGATCCAGGACAC</u> <u>AAATGACATCAACGACATCACATACGCAGACCTGAATCTGCC</u></p>
55		<p><u>CAAAGAGAAGAAGCCCGCACCCCGGGCCCTGAGCCTAACAA</u> <u>CCACACAGAATATGCAAGCATTGAGACAGGCAAAGTGCCTAG</u> <u>GCCAGAGGATACCCTCACCTATGCTGACCTGGACATGGTCCA</u> <u>CCTCAGCCGGGCACAGCCAGCCCCCAAGCCTGAGCCATCTTTC</u></p>
60		<p><u>TCAGAGTATGCTAGTGTCCAGGTCCAGAGGAAGTGAATGGGG</u> <u>CTGTGGTCTGTACTAGGCCCATCCCCACAAGTTTCTTGTCTT</u> <u>ACATGGAGTGGCCATGACGAGGACATCCAGCCAGCCAATCCT</u> <u>GTCCCCAGAAGGCCAGGTGGCACGGGTCCTAGGACCAGGGGT</u></p>
65		<p><u>AAGGGTGGCCTTTGTCTTCCCTCCGTGGCTCTTCAACACCTCTT</u> <u>GGGCACCCACGTCCCCTTCTCCGGAGGCTGGGTGTTGCAGAA</u> <u>CCAGAGGGCGAACTGGAGAAAGCTGCCTGGAATCCAAGAAGT</u> <u>GTTGTGCCTCGGCCATCCTCGTGGGTCTGGATCTGCTGTT</u></p>
70		<p><u>GGCAACCCAGGTTGCGTCTTGATGTTCCAGAGCTTGGTCTT</u> <u>CTGTGTGGAGAAGAGCTCACCATCTTACCCAACCTGAGCTTT</u> <u>GGGACCAGACTCCCTTTAGATCAAACCGCCCCATCTGTGGAA</u></p>

(continuación)

5 GAACTACACCAGAAGTCAGCAAGTTTTCAGCCAACAGTGCTG
GCCTCCCCACCTCCCAGGCTGACTAGCCCTGGGGAGAAGGAA
CCCTCTCCTCCTAGACCAGCAGAGACTCCCTGGGCATGTTCAG
TGTGGCCCCACCTCCCTTCCAGTCCCAGCTTGCTTCCTCCAGCT
AGCACTAACTCAGCAGCATCGCTCTGTGGACGCCTGTAAATTA
TTGAGAAATGTGAACTGTGCAGTCTTAAAGCTAAGGTGTTAG
AAAATTTGATTTATGCTGTTTAGTTGTTGTTGGGTTTCTTTTCT
TTTTAATTTCTTTTTCTTTTTTGATTTTTTTTCTTTCCCTTAAAA
CAACAGCAGCAGCATCTTGGCTCTTGTGCATGTGTTGAATGGT
TGGGTCTTGTGAAGTCTGAGGTCTAACAGTTTATTGTCCTGGA
AGGATTTTCTTACAGCAGAAACAGATTTTTTTCAAATCCCAG
AATCCTGAGGACCAAGAAGGATCCCTCAGCTGCTACTTCCAG
CACCCAGCGTCACTGGGACGAACCAGGCCCTGTTCTTACAAG
GCCACATGGCTGGCCCTTTCCTCCATGGCTACTGTGGTAAGT
GCAGCCTTGTCTGACCCAATGCTGACCTAATGTTGGCCATTCC
ACATTGAGGGGACAAGGTCAGTGATGCCCCCTTCACTCACA
AGCACTTCAGAGGCATGCAGAGAGAAGGGACACTCGGCCAGC
TCTCTGAGGTAATCAGTGCAAGGAGGAGTCCGTTTTTTGCCAG
CAAACCTCAGCAGGATCACACTGGAACAGAACCTGGTCATAC
CTGTGACAACACAGCTGTGAGCCAGGGCAAACCACCCACTGT
CACTGGCTCGAGAGTCTGGGCAGAGGCTCTGACCTCCACCCT
TTAAACTGGATGCCGGGGCCTGGCTGGGCCCAATGCCAAGTG
GTTATGGCAACCCTGACTATCTGGTCTTAACATGTAGCTCAGG
AAGTGGAGGCGCTAATGTCCCAATCCCTGGGGATTCTGATT
CCAGCTATTCATGTAAGCAGAGCCAACCTGCCTATTTCTGTAG
GTGCGACTGGGATGTTAGGAGCACAGCAAGGACCCAGCTCTG
TAGGGCTGGTGACCTGATACTTCTCATAATGGCATCTAGAAGT
TAGGCTGAGTTGGCCTCACTGGCCAGCAAACCAGAACTTGT
CTTGTCCGGGCCATGTTCTTGGGCTGTCTTCTAATCCAAAG
GGTTGGTTGGTAAAGCTCCACCCCCTTCTCCTCTGCCTAAAGA
CATCACATGTGTATACACACACGGGTGTATAGATGAGTTAAA
AGAATGTCCTCGCTGGCATCCTAATTTTGTCTTAAGTTTTTTG
GAGGGAGAAAGGAACAAGGCAAGGGAAGATGTGTAGCTTTG
GCTTTAACCAGGCAGCCTGGGGGCTCCCAAGCCTATGGAACC
CTGGTACAAAGAAGAGAACAGAAGCGCCCTGTGAGGAGTGG
GATTTGTTTTCTGTAGACCAGATGAGAAGGAAACAGGCCCT
GTTTTGTACATAGTTGCAACTTAAAATTTTTGGCTTGCAAAAT
ATTTTTGTAATAAAGATTTCTGGGTAACAATAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA (sec. con núm. de ident.: 1)

50 Proteína SIRP α de
 ratón NP_031573.2
MEPAGPAPGRLGPLLLCLLLSASCFCTGATGKELKVTQPEKSVSV
AAGDSTVLNCTLTSLLPVGPPIRWYRGVGPSRLLIYSFAGEYVPRI
RNVSDTTKRNNMDFSIRISNVTPADAGIYYCVKFQKGSSEPDTEI
QSGGGTEVYVLAKPSPPEVSGPADRGIPDQKNFTCKSHGFSPRN
ITLKWFKDGQELHPLETTVNPSGKNVSYNISSTVRVVLNSMDVN
SKVICEVAHITLDRSPLRGIANLSNFIRVSPTVKVTQQSPTSMNQV
NLTCRAERFYPEDLQLIWLENGNVSRNDTPKNLTKNTDGTNYNT
SLFLVNSSAHREDVVFTCQVKHDQQAITRNHTVLGFAHSSDQG
SMQTFPDNNATHNWNVFIGVGVACALLVVLLMAALYLLRIKQKKAK
GSTSSTRLHEPEKNAREITQIQDTNDINDITYADLNLPKEKKPAPRAP
EPNNHTEYASIETGKVPRPEDTLTYADLDMVHLSRAQPAPKPEPSFS
EYASVQVQRK (sec. con núm. de ident.: 2)

65

ES 2 624 614 T3

(continuación)

ADN de SIRP α
humana
NM_001040022.1

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

TCCGGCCCCGACCCACCCCCAAGAGGGGCCTTCAGCTTTGGG
GCTCAGAGGCACGACCTCCTGGGGAGGGTTAAAAGGCAGACG
CCCCCCCCGCCCCCGCGCCCCCGCGCCCCGACTCCTTCGCCGC
CTCCAGCCTCTCGCCAGTGGGAAGCGGGGAGCAGCCGCGCGG
CCGGAGTCCGGAGGCGAGGGGAGGTCGGCCGCAACTTCCCCG
GTCCACCTTAAGAGGACGATGTAGCCAGCTCGCAGCGCTGAC
CTTAGAAAAACAAGTTTGCGCAAAGTGGAGCGGGGACCCGGC
CTCTGGGCAGCCCCGGCGGCGCTTCCAGTGCCTTCCAGCCCTC
GCGGGCGGCGCAGCCGCGGCCATGGAGCCCGCCGGCCCGGC
CCCCGGCCGCTCGGGCCGCTGCTCTGCCTGCTGCTCGCCGCG
TCCTGCGCCTGGTCAGGAGTGGCGGGTGAGGAGGAGCTGCAG
GTGATTCAGCCTGACAAGTCCGTGTTGGTTGCAGCTGGAGAG
ACAGCCACTCTGCGCTGCACTGCGACCTCTCTGATCCCTGTGG
GGCCCATCCAGTGGTTCAGAGGAGCTGGACCAGGCCGGGAAT
TAATCTACAATCAAAAAGAAGGCCACTTCCCCCGGGTAACAA
CTGTTTCAGACCTCACAAAGAGAAACAACATGGACTTTTCCAT
CCGCATCGGTAACATCACCCCAGCAGATGCCGGCACCTACTA
CTGTGTGAAGTTCCGGAAAGGGAGCCCCGATGACGTGGAGTT
TAAGTCTGGAGCAGGCACTGAGCTGTCTGTGCGCGCCAAACC
CTCTGCCCCCGTGGTATCGGGCCCTGCGGCGAGGGCCACACCT
CAGCACACAGTGAGCTTCACTGCGAGTCCCACGGCTTCTCAC
CCAGAGACATCACCTGAAATGGTTCAAAAATGGGAATGAGC
TCTCAGACTTCCAGACCAACGTGGACCCCGTAGGAGAGAGCG
TGTCCTACAGCATCCACAGCACAGCCAAGGTGGTGCTGACCC
GCGAGGACGTTCACTCTCAAGTCATCTGCGAGGTGGCCACG
TCACCTTGCAAGGGGACCCTCTTCGTGGGACTGCCAACTTGTC
TGAGACCATCCGAGTTCACCCACCTTGGAGGTTACTCAACAG
CCCGTGAGGGCAGAGAACCAGGTGAATGTCACCTGCCAGGTG
AGGAAGTTCTACCCCCAGAGACTACAGCTGACCTGGTTGGAG
AATGGAAACGTGTCCCGGACAGAAACGGCCTCAACCGTTACA
GAGAACAAGGATGGTACCTACAACCTGGATGAGCTGGCTCCTG
GTGAATGTATCTGCCACAGGGATGATGTGAAGCTCACCTGC
CAGGTGGAGCATGACGGGCAGCCAGCGGTCAGCAAAAAGCCAT
GACCTGAAGGTCTCAGCCCACCCGAAGGAGCAGGGCTCAAAT
ACCGCCGCTGAGAACACTGGATCTAATGAACGGAACATCTAT
ATTGTGGTGGGTGTGGTGTGCACCTTGCTGGTGGCCCTACTGA
TGGCGGCCCTCTACCTCGTCCGAATCAGACAGAAGAAAGCCC
AGGGCTCCACTTCTTCTACAAGGTTGCATGAGCCCAGAGAAGA
ATGCCAGAGAAATAACACAGGACACAAATGATATCACATATG
CAGACCTGAACCTGCCAAGGGGAAGAAGCCTGCTCCCCAGG
CTGCGGAGCCCAACAACCACACGGAGTATGCCAGCATTGAGA
CCAGCCCCGAGCCCGCGTCCGGAGGACACCCCTCACCTATGCTG
ACCTGGACATGGTCCACCTCAACCGGACCCCCAAGCAGCCGG
CCCCCAAGCCTGAGCCGTCCTTCTCAGAGTACGCCAGCGTCCA
GGTCCCAGGAAGTGAATGGGACCGTGGTTTGTCTAGCACC
CATCTCTACGCGCTTTCTTGTCCCACAGGGAGCCGCGGTGATG
AGCACAGCCAACCCAGTTCCCGGAGGGCTGGGGCGGTGCAGG
CTCTGGGACCCAGGGGCCAGGGTGGCTCTTCTCTCCCCACCC
TCCTTGGCTCTCCAGCACTTCTGGGCAGCCACGGCCCCCTCC
CCCCACATTGCCACATACTGGAGGCTGACGTTGCCAAACCA
GCCAGGGAACCAACCTGGGAAGTGGCCAGAAGTGCCTGGGGT

(continuación)

5 CCAAGAACTCTTGTGCCTCCGTCATCACCATGTGGGTTTTGA
 AGACCCCTCGACTGCCTCCCCGATGCTCCGAAGCCTGATCTTCC
 AGGGTGGGGAGGAGAAAATCCCACCTCCCCTGACCTCCACCA
 CCTCCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCCTACCACCAC
 CACCCAACCTGGGGCTAGAGTGGGGAAGATTTCCCCTTTAGAT
 10 CAAACTGCCCTTCCATGGAAAAGCTGGAAAAAAACTCTGGA
 ACCCATATCCAGGCTTGGTGAGGTTGCTGCCAACAGTCCTGGC
 CTCCCCATCCCTAGGCTAAAGAGCCATGAGTCCTGGAGGAG
 GAGAGGACCCCTCCCAAAGGACTGGAGACAAAACCTCTGCT
 TCCTTGGGTCCCTCCAAGACTCCCTGGGGCCCAACTGTGTTGC
 15 TCCACCCGGACCCATCTCTCCCTTCTAGACCTGAGCTTGCCCC
 TCCAGCTAGACTAAGCAACATCTCGCTGTGGACGCCTGTAA
 ATTACTGAGAAATGTGAAACGTGCAATCTTGAAACTGAGGTG
 TTAGAAAACCTTGATCTGTGGTGTTTTGTTTTGTTTTTTTTCTTA
 20 AAACAACAGCAACGTGATCTTGGCTGTCTGTCATGTGTTGAAG
 TCCATGGTTGGGTCTTGTGAAGTCTGAGGTTAACAGTTTGT
 GTCCTGGAGGGATTTTCTTACAGCGAAGACTTGAGTTCCTCCA
 AGTCCCAGAACCCCAAGAATGGGCAAGAAGGATCAGGTCAGC
 25 CACTCCCTGGAGACACAGCCTTCTGGCTGGGACTGACTTGCC
 ATGTTCTCAGCTGAGCCACGCGGCTGGTAGTGCAGCCTTCTGT
 GACCCCGCTGTGGTAAGTCCAGCCTGCCAGGGCTGCTGAGG
 GCTGCCTCTTGACAGTGCAGTCTTATCGAGACCCAATGCCTCA
 GTCTGCTCATCCGTAAAGTGGGGATAGTGAAGATGACACCCC
 30 TCCCCACCACCTCTCATAAGCACTTTAGGAACACACAGAGGG
 TAGGGATAGTGGCCCTGGCCGTCTATCCTACCCCTTTAGTGAC
 CGCCCCATCCCGGCTTTCTGAGCTGATCCTTGAAGAAGAAAT
 CTTCCATTTCTGCTCTCAAACCCTACTGGGATCAAACCTGGAAT
 35 AAATTGAAGACAGCCAGGGGGATGGTGCAGCTGTGAAGCTCG
 GGCTGATTCCCCCTCTGTCCCAGAAGGTTGGCCAGAGGGGTG
 ACCCAGTTACCCCTTAACCCCAACCCTTCCAGTCGGGTGTGAG
 GGCCTGACCGGGCCAGGGCAAGCAGATGTCGCAAGCCCTAT
 40 TTATTCAGTCTTCACTATAACTCTTAGAGTTGAGACGCTAATG
 TTCATGACTCCTGGCCTTGGGATGCCAAGGGATTTCTGGCTC
 AGGCTGTAAAAGTAGCTGAGCCATCCTGCCATTCTGGAGG
 TCCTACAGGTGAAACTGCAGGAGCTCAGCATAGACCCAGCTC
 45 TCTGGGGGATGGTACCTGGTGATTTCAATGATGGCATCCAGG
 AATTAGCTGAGCCAACAGACCATGTGGACAGCTTTGGCCAGA
 GCTCCCGTGTGGCATCTGGGAGCCACAGTGACCCAGCCACCT
 GGCTCAGGCTAGTTCCAAATTCCAAAAGATTGGCTTGTAACC
 50 TTCGTCTCCCTCTCTTTACCCAGAGACAGCACATACGTGTGC
 ACACGCATGCACACACACATTCAGTATTTTAAAAGAATGTTTT
 CTGGGTGCCATTTTCATTTTATTTTATTTTAAATTCTTGGAGG
 GGGAAATAAGGGAATAAGGCCAAGGAAGATGTATAGCTTTAG
 CTTTAGCCTGGCAACCTGGAGAATCCACATACCTTGTGTATTG
 55 AACCCAGGAAAAGGAAGAGGTCGAACCAACCCTGCGGAAG
 GAGCATGGTTTCAGGAGTTTATTTTAAAGACTGCTGGGAAGGA
 AACAGGCCCCATTTTGTATATAGTTGCAACTTAAACTTTTTGG
 CTTGCAAAATATTTTGTAAATAAAGATTTCTGGGTAATAATGA

(sec. con núm. de ident.: 3)

Proteína SIRP α humana
 NP_001035111.1

MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKSVL
VAAGETATLRCTATSLIPVGPVWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPR

65

(continuación)

5 VTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYVKFRKGPDDVEF
 KSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFSR
 ITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTR
 QVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPPTLEVTQQPVRA
 10 NVTCQVRKFPYQRLQLTWLENGNVSRTETASTVTENKDG
 MSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVS
 EQGSNTAAENTGSNERNIYVVGVVCTLLVALLMAALYLVR
 QGSTSSTRLHEPEKNAREITQDTNDITYADLNLPKGKKPAP
 NHTEYASIQTSPQPA SEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPK
 15 ASVQVPRK (sec. con núm. de ident.: 4)

Proteína SIRP α
 humanizada

20 MEPAGPAPGRLGPLLLCLLSASCFCTVAGEEELQVIQPKSVL
 VAAGETATLRCTATSLIPVGPQWFRGAGPGRILIYNQKEGH
 VTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYVKFRKGPDDVE
 KSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFSR
 ITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTR
 QVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPPTLEVTQQPVRA
 25 NVTCQVRKFPYQRLQLTWLENGNVSRTETASTVTENKDG
 MSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVS
 EQGSNTAADNNATHNWNVFIGVGVACALLVLLMAALYLLRI
 AKGSTSSTRLHEPEKNAREITQIQDTNDINDITYADLNLPKE
 APEPNNHTEYASIEGKVP RPEDTLTYADLDMVHLSRAQPAP
 30 FSEYASVQVQRK (sec. con núm. de ident.: 5)

Animales no humanos con SIRP α humanizado

35 Se describen animales no humanos que expresan proteínas SIRP α humanizadas en la superficie de células inmunitarias (por ejemplo, células mieloides) de los animales no humanos como resultado de una modificación genética de un locus endógeno del animal no humano que codifica una proteína SIRP α . Los ejemplos adecuados descritos en el presente documento incluyen roedores, particularmente, ratones.

40 Un gen de SIRP α humanizado, descrito en el presente documento puede comprender material genético de una especie heteróloga (por ejemplo, seres humanos), en donde el gen de SIRP α humanizado codifica una proteína SIRP α que comprende la porción codificada del material genético de la especie heteróloga. Un gen de SIRP α humanizado descrito en el presente documento puede comprender ADN genómico de una especie heteróloga que corresponde a la porción extracelular de una proteína SIRP α que se expresa en la membrana plasmática de una
 45 célula. Se proporcionan, además, animales no humanos, embriones, células y construcciones de transformación para producir animales no humanos, embriones no humanos, y células que contienen dicho gen de SIRP α humanizado.

Puede eliminarse un gen endógeno de SIRP α . Un gen endógeno de SIRP α puede alterarse, en donde una porción del gen endógeno de SIRP α se reemplaza con una secuencia heteróloga (por ejemplo, una secuencia de SIRP α humana en su totalidad o en parte). La totalidad o sustancialmente la totalidad de un gen de SIRP α endógeno se reemplaza con un gen heterólogo (por ejemplo, un gen de SIRP α humano). Una porción de un gen heterólogo de SIRP α puede insertarse en un gen endógeno de SIRP α no humano en un locus endógeno de SIRP α . El gen heterólogo puede ser un gen humano. La modificación o humanización puede realizarse a una de las dos copias del
 50 gen endógeno de SIRP α , lo que da lugar a un animal no humano que es heterocigoto con respecto al gen de SIRP α humanizado. Se describe un animal no humano que es homocigoto para un gen de SIRP α humanizado.

Un animal no humano descrito en el presente documento contiene un gen de SIRP α humano en su totalidad o en parte en un locus endógeno de SIRP α no humano. Así, tales animales no humanos pueden describirse como que
 60 tienen un gen de SIRP α heterólogo. El gen de SIRP α reemplazado, insertado o modificado en el locus de SIRP α endógeno puede detectarse con el uso de una variedad de métodos que incluyen, por ejemplo, PCR, transferencia de Western, transferencia de Southern, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), o un ensayo de ganancia o pérdida de alelos. El animal no humano puede ser heterocigoto con respecto al gen de SIRP α humanizado

65

Un gen de SIRP α humanizado descrito en el presente documento incluye un gen de SIRP α que tiene un segundo, tercero y cuarto exones donde cada uno tiene una secuencia al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a un segundo, tercero y cuarto exones que aparecen en un gen de SIRP α humano de la Tabla 3.

Un gen de SIRP α humanizado descrito en el presente documento incluye un gen de SIRP α que tiene una secuencia nucleotídica codificante (por ejemplo, una secuencia de ADNc) al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a los nucleótidos 352 - 1114 que aparecen en un ADNc humano de una secuencia de SIRP α de la Tabla 3.

Una proteína SIRP α humanizada producida por un animal no humano descrito en el presente documento puede tener una porción extracelular con una secuencia que es al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una porción extracelular de una proteína SIRP α humana que aparece en la Tabla 3.

Una proteína SIRP α humanizada producida por un animal no humano descrito en el presente documento puede tener una porción extracelular que tiene una secuencia que es al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a los residuos de aminoácidos 28 - 362 que aparecen en una proteína SIRP α humana de la Tabla 3.

Una proteína SIRP α humanizada producida por un animal no humano descrito en el presente documento puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una secuencia de aminoácidos de una proteína SIRP α humanizada que aparece en la Tabla 3.

Se describen composiciones y métodos para producir animales no humanos que expresan una proteína SIRP α humanizada, que incluye formas polimórficas específicas o variantes alélicas (por ejemplo, diferencias en un solo aminoácido) que incluyen composiciones y métodos para producir animales no humanos que expresan tales proteínas a partir de un promotor humano y una secuencia reguladora humana. Se proporcionan, además, composiciones y métodos para producir animales no humanos que expresan tales proteínas a partir de un promotor endógeno y una secuencia reguladora endógena. Los métodos incluyen insertar el material genético que codifica una proteína SIRP α humana en su totalidad o en parte en una ubicación precisa en el genoma de un animal no humano que corresponde a un gen endógeno de SIRP α para crear de esta manera un gen de SIRP α humanizado que expresa una proteína SIRP α que es humana en su totalidad o en parte. Los métodos pueden incluir insertar ADN genómico correspondiente a los exones 2 - 4 de un gen de SIRP α humano en un gen endógeno de SIRP α del animal no humano para crear de esta manera un gen humanizado que codifica una proteína SIRP α que contiene una porción humana que contiene los aminoácidos codificados por los exones insertados.

Un enfoque de un gen de SIRP α humanizado emplea una modificación relativamente mínima del gen endógeno y puede dar como resultado una transducción natural de señales mediadas por SIRP α en el animal no humano, porque la secuencia genómica de las secuencias de SIRP α se modifican en un solo fragmento y por lo tanto retienen la funcionalidad normal al incluir las secuencias reguladoras necesarias. Así, la modificación del gen de SIRP α puede no afectar otros genes cercanos u otros genes endógenos de SIRP. Además, la modificación puede no afectar el ensamblaje de un receptor funcional en la membrana celular y mantiene sus funciones efectoras normales por medio de la unión y posterior transducción de señales a través de la porción citoplasmática del receptor que no se afecta por la modificación.

Una ilustración esquemática (no a escala) de un gen de SIRP α endógeno murino y un gen de SIRP α humanizado se proporciona en la Figura 1. Como se ilustra, el ADN genómico que contiene los exones 2 - 4 de un gen de SIRP α humano se inserta en un locus de un gen de SIRP α endógeno murino mediante una construcción de transformación. Este ADN genómico incluye la porción del gen que codifica una porción extracelular (por ejemplo, los residuos de aminoácidos 28 - 362) de una proteína SIRP α humana responsable de la unión a ligandos.

Un animal no humano (por ejemplo, un ratón) que tiene un gen de SIRP α humanizado en el locus de SIRP α endógeno puede producirse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede producirse un vector de transformación que introduce un gen de SIRP α humano en su totalidad o en parte con un gen marcador de selección. La Figura 1 ilustra un genoma de ratón que comprende una inserción de los exones 2 - 4 de un SIRP α humano. Como se ilustra, la construcción de transformación contiene un brazo de homología en 5' que contiene una secuencia corriente arriba del exón 2 de un gen de SIRP α endógeno murino, seguido por un fragmento de ADN genómico que contiene los exones 2 - 4 de un gen de SIRP α humano, un casete de selección por fármacos (por ejemplo, un gen de resistencia a la neomicina flanqueado en ambos extremos por secuencias loxP), y un brazo de homología en 3' que contiene una secuencia corriente abajo del exón 4 de un gen de SIRP α endógeno murino. Después de la recombinación homóloga, los exones 2 - 4 de un gen de SIRP α endógeno murino se reemplaza por la secuencia contenida en el vector de transformación. Se crea un gen de SIRP α humanizado que da como resultado una célula o animal no humano que expresa una proteína SIRP α humanizada que contiene los aminoácidos

codificados por los exones 2 - 4 de un gen de SIRP α humano. El casete de selección por fármacos puede eliminarse opcionalmente mediante la adición posterior de una recombinasa (por ejemplo, mediante tratamiento con Cre).

Además de ratones que tienen genes de SIRP α humanizados como se describe en el presente documento, en el presente documento se describen además otros animales no humanos modificados genéticamente que comprenden genes de SIRP α humanizados. Tales animales no humanos pueden comprender un gen de SIRP α humanizado unido operativamente a un promotor endógeno de SIRP α . Tales animales no humanos pueden expresar una proteína SIRP α humanizada a partir de un locus endógeno, en donde la proteína SIRP α humanizada comprende los residuos de aminoácidos 28 - 362 de una proteína SIRP α humana.

Tales animales no humanos pueden seleccionarse del grupo que consiste en un ratón, rata, conejo, cerdo, bovino (por ejemplo, vaca, toro, búfalo), ciervo, oveja, cabra, pollo, gato, perro, hurón, primates (por ejemplo, tití, mono rhesus). Para los animales no humanos donde las células ES modificables genéticamente no están disponibles fácilmente, se emplean otros métodos para producir un animal no humano que comprende las modificaciones genéticas descritas en el presente documento. Tales métodos incluyen, por ejemplo, la modificación de un genoma de células que no son ES (por ejemplo, un fibroblasto o una célula pluripotente inducida) y el empleo de la transferencia nuclear para transferir el genoma modificado a una célula adecuada, por ejemplo, un ovocito, y la gestación de la célula modificada (por ejemplo, el ovocito modificado) en un animal no humano en condiciones adecuadas para formar un embrión.

Un animal no humano descrito en el presente documento puede ser un mamífero. Un animal no humano descrito en el presente documento puede ser un mamífero pequeño, por ejemplo, de la superfamilia Dipodoidea o Muroidea. Un animal modificado genéticamente descrito en el presente documento puede ser un roedor. Un roedor descrito en la presente descripción puede seleccionarse de un ratón, una rata, y un hámster. Un roedor puede seleccionarse de la superfamilia Muroidea. Un animal modificado genéticamente descrito en el presente documento puede ser de una familia seleccionada de Calomyscidae (por ejemplo, hámsteres similares a ratón), Cricetidae (por ejemplo, hámster, ratas y ratones del Nuevo Mundo, ratones campestres), Muridae (ratones y ratas verdaderos, jerbos, ratones espinosos, ratas crestadas), Nesomyidae (ratones trepadores, ratones de roca, ratas coliblancas, ratas y ratones de Madagascar), Platacanthomyidae (por ejemplo, lirones espinosos), y Spalacidae (por ejemplo, ratas topo, ratas de bambú, y zokor). Un roedor modificado genéticamente descrito en el presente documento puede seleccionarse de un ratón o una rata verdaderos (familia Muridae), un jerbo, un ratón espinoso, y una rata crestada. Un ratón modificado genéticamente descrito en el presente documento puede ser un miembro de la familia Muridae. Un animal no humano descrito en el presente documento puede ser un roedor. Un roedor descrito en el presente documento puede seleccionarse de un ratón y una rata. En algunas modalidades, un animal no humano descrito en el presente documento puede ser un ratón.

En algunas modalidades, un ratón de la presente invención es de una cepa 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. En algunas modalidades determinadas, un ratón de la presente invención es de una cepa 129 seleccionada del grupo que consiste en una cepa que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129/SvJae, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (ver, por ejemplo, Festing y otros, 1999, Mammalian Genome 10:836; Auerbach y otros, 2000, Biotechniques 29(5):1024-1028, 1030, 1032). En algunas modalidades determinadas, un ratón modificado genéticamente de la presente invención es una mezcla de una cepa 129 mencionada anteriormente y una cepa C57BL/6 mencionada anteriormente. En algunas modalidades determinadas, un ratón de la presente invención es una mezcla de las cepas 129 mencionadas anteriormente, o una mezcla de las cepas BL/6 mencionadas anteriormente. En algunas modalidades determinadas, una cepa 129 de la mezcla como se describe en el presente documento es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En algunas modalidades, un ratón de la presente invención es de una cepa BALB, por ejemplo, la cepa BALB/c. En algunas modalidades, un ratón de la presente invención es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa mencionada anteriormente.

Un animal no humano descrito en el presente documento puede ser una rata. En algunas modalidades determinadas, una rata de la presente invención se selecciona de una rata Wistar, una cepa LEA, una cepa Sprague Dawley, una cepa Fischer, F344, F6, y Dark Agouti. En algunas modalidades determinadas, una cepa de rata como se describe en el presente documento es una mezcla de dos o más cepas seleccionadas del grupo que consiste en Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6, y Dark Agouti.

Métodos que emplean animales no humanos que tienen genes de SIRP α humanizados

Se han informado animales no humanos mutantes y transgénicos para SIRP α (por ejemplo, ratones) (Inagaki y otros, 2000, EMBO Journal 19(24):6721-6731; Strowig y otros, 2011, Proc. Nat. Acad. Sci. 108(32):13218-13223). Tales animales se han empleado en una variedad de ensayos para determinar los aspectos moleculares de la expresión, función y regulación de SIRP α . Sin embargo, no lo han sido sin limitación. Por ejemplo, el uso de ratones mutantes para SIRP α se ha limitado debido a las condiciones perjudiciales para la salud que resultan de la incapacidad de las células que contienen la forma mutante de SIRP α frente a la señal. Además, dado que CD47, un ligando de SIRP α , pudiera estar presente en la misma célula que la forma mutante de SIRP α y ambas proteínas son

capaces de proporcionar señales intracelulares, no es posible distinguir si tales resultados provienen de la ausencia de señalización de SIRP α o la ausencia de unión a CD47. En el caso de los ratones transgénicos para SIRP α humano, el SIRP α de ratón está intacto y funcional. Así, las funciones dependientes de SIRP α en diversos procesos biológicos (por ejemplo, injertos) no pueden atribuirse claramente a la función de SIRP α humano o SIRP α de ratón solas en estos ratones ya que ambos receptores SIRP α humano y de ratón están presentes y funcionales.

Los animales no humanos descritos en el presente documento proporcionan un sistema in vivo mejorado y una fuente de materiales biológicos (por ejemplo, células) que expresan SIRP α humano, los cuales son útiles para una variedad de ensayos. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden usarse para desarrollar agentes terapéuticos que se dirijan a SIRP α y/o modulen la señalización SIRP α -CD47. En diversas modalidades, los ratones de la presente invención se usan para tamizar y desarrollar agentes terapéuticos candidatos (por ejemplo, anticuerpos) que se unen al SIRP α humano. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden usarse para determinar el perfil de unión de antagonistas y/o agonistas al SIRP α humanizado en la superficie de una célula de un animal no humano como se describe en el presente documento.

Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden usarse para medir el efecto terapéutico de bloquear o modular la transducción de señales de SIRP α (por ejemplo, fosforilación) y el efecto sobre la expresión génica como resultado de cambios celulares. Un animal no humano descrito en el presente documento o células aisladas a partir de él pueden exponerse a un agente terapéutico candidato que se une a un SIRP α humano en la superficie de una célula del animal no humano y, después de un período de tiempo posterior, analizarse para determinar los efectos sobre los procesos dependientes de SIRP α , por ejemplo, proliferación de células B y/o T, aclaramiento de plaquetas, e inducción de la expresión de citocinas.

Los animales no humanos descritos en el presente documento expresan una proteína SIRP α humanizada, por lo tanto pueden generarse células, líneas celulares, y cultivos celulares para servir como una fuente de SIRP α humanizado para usar en ensayos de unión y funcionalidad, por ejemplo, para ensayar la unión o función de un antagonista o agonista de SIRP α , particularmente cuando el antagonista o agonista es específico para una secuencia o epítipo de SIRP α humano. Una proteína SIRP α humanizada expresada por un animal no humano como se describe en el presente documento puede comprender una variante de la secuencia de aminoácidos. Se han informado variantes de proteínas SIRP α humanas que tienen variaciones asociadas con los residuos de unión al ligando. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden expresar una variante de una proteína SIRP α humanizada. La variante puede ser polimórfica en una posición de un aminoácido asociado con la unión al ligando. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden usarse para determinar el efecto de unión al ligando a través de la interacción con una variante polimórfica de SIRP α humana.

Las células de los animales no humanos descritos en el presente documento pueden aislarse y usarse sobre una base ad hoc, o pueden mantenerse en cultivo por muchas generaciones. Las células de un animal no humano descrito en el presente documento pueden inmortalizarse y mantenerse en cultivo indefinidamente (por ejemplo, en cultivos en serie).

Las células de animales no humanos descritos en el presente documento pueden usarse en un ensayo de dispersión o migración celular para tamizar y desarrollar agentes terapéuticos candidatos que modulen el SIRP α humano. Tales procesos son necesarios para muchos procesos celulares que incluyen la cicatrización de heridas, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia.

Las células de animales no humanos descritos en el presente documento pueden usarse en ensayos de clonación para células megacariocíticas formadoras de colonias para analizar los aspectos farmacotológicos de agentes terapéuticos candidatos que se dirigen a SIRP α humano.

Las células de animales no humanos descritos en el presente documento pueden usarse en ensayos de fagocitosis para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos que modulen la regulación de la fagocitosis dependiente de SIRP α .

Los animales no humanos descritos en el presente documento proporcionan un sistema in vivo para el análisis y prueba de un fármaco o vacuna. Un fármaco o vacuna candidato puede suministrarse a uno o más animales no humanos descritos en el presente documento, seguido del control de los animales no humanos para determinar una o más respuestas inmunitarias frente al fármaco o vacuna, el perfil de seguridad del fármaco o vacuna, o el efecto sobre una enfermedad o afección. Tales fármacos o vacunas pueden mejorarse y/o desarrollarse en tales animales no humanos.

Los animales no humanos descritos en el presente documento proporcionan un sistema in vivo mejorado para elucidar los mecanismos de la interacción de célula a célula humana a través de transferencia adoptiva. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden implantarse con un xenoinjerto de tumor, seguido de un segundo implante de linfocitos infiltrantes de tumores que pueden implantarse en los animales no humanos mediante transferencia adoptiva para determinar la eficacia en la erradicación de tumores sólidos u otras enfermedades malignas. Tales experimentos pueden realizarse con células humanas debido a la presencia

exclusiva de SIRP α humano sin competencia con SIRP α endógeno del animal no humano. Además, las terapias y los agentes farmacéuticos para usar en el xenotrasplante pueden mejorarse y/o desarrollarse en tales animales no humanos.

5 Los animales no humanos descritos en el presente documento proporcionan un sistema in vivo mejorado para el mantenimiento y desarrollo de células madre hematopoyéticas humanas a través del injerto. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden proporcionar un mejor desarrollo y mantenimiento de las células madre humanas dentro del animal no humano. Puede observarse un aumento de poblaciones de células B y T humanas diferenciadas en la sangre, médula ósea, bazo y timo del animal no humano. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden proporcionar un aumento en el nivel del injerto de células humanas en comparación con animales no humanos que expresan SIRP α de ratón y humana.

15 Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden emplearse para evaluar la eficacia de un fármaco terapéutico dirigido a células humanas. Un animal no humano descrito en el presente documento puede recibir un trasplante de células humanas, y un candidato a fármaco dirigido a dichas células humanas se administra a dicho animal no humano. Después se determina la eficacia terapéutica del fármaco mediante el control de las células humanas en el animal no humano después de la administración del fármaco. Los fármacos que pueden someterse a prueba en los animales no humanos incluyen compuestos moleculares pequeños, es decir, compuestos de pesos moleculares menores que 1500 kD, 1200 kD, 1000 kD, u 800 dalton, y compuestos moleculares grandes (tales como proteínas, por ejemplo, anticuerpos), que tienen efectos terapéuticos previstos para el tratamiento de enfermedades y afecciones humanas al dirigirse a células humanas (por ejemplo, unión a ellas y/o acción sobre ellas).

25 El fármaco puede ser un fármaco anticancerígeno, y las células humanas pueden ser células cancerosas, que pueden ser células de un cáncer primario o células de líneas celulares establecidas a partir de un cáncer primario. En estos aspectos, un animal no humano descrito en el presente documento recibe un trasplante de células cancerosas humanas, y se le suministra un fármaco anticancerígeno al animal no humano. La eficacia del fármaco puede determinarse al evaluar si el crecimiento o la metástasis de las células cancerosas humanas en el animal no humano se inhibe como resultado de la administración del fármaco.

30 El fármaco anticancerígeno puede ser una molécula de anticuerpo, que se une a un antígeno en las células cancerosas humanas. El fármaco anticancerígeno puede ser un anticuerpo biespecífico que se une a un antígeno en las células cancerosas humanas, y a un antígeno en otras células humanas, por ejemplo, células del sistema inmunitario humano (o "células inmunitarias humanas") tales como células B y células T.

35 Un animal no humano descrito en el presente documento puede recibir un injerto de células inmunitarias humanas o células que se diferencian en células inmunitarias humanas. Dicho animal no humano con las células inmunitarias humanas injertadas recibe un trasplante de células cancerosas humanas, y recibe una administración de un fármaco anticancerígeno, tal como un anticuerpo biespecífico que se une a un antígeno sobre las células cancerosas humanas y a un antígeno sobre las células inmunitarias humanas (por ejemplo, células T). La eficacia terapéutica del anticuerpo biespecífico puede evaluarse en base a su capacidad para inhibir el crecimiento o las metástasis de las células cancerosas humanas en el animal no humano. El animal no humano descrito en el presente documento puede recibir un injerto de células progenitoras hematopoyéticas humanas CD34+ que producen células inmunitarias humanas (que incluyen células T, células B, células NK, entre otras). Las células de linfoma de células B humanas (por ejemplo, células Raji) se trasplantan en dicho animal no humano con células inmunitarias humanas injertadas, el cual se administra después con un anticuerpo biespecífico que se une a CD20 (un antígeno en las células B normales y determinados tumores malignos de células B) y a la subunidad CD3 del receptor de células T, para probar la capacidad del anticuerpo biespecífico para inhibir el crecimiento del tumor en el animal no humano.

50 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos en la técnica cómo realizar y usar los métodos y composiciones descritos en el presente documento, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. A menos que se indique de cualquier otra manera, la temperatura se indica en Celsius, y la presión es la atmosférica o está cercana a esta.

Ejemplo 1. Humanización de un gen endógeno de proteína reguladora de señales (SIRP).

60 Este ejemplo muestra métodos ilustrativos para la humanización de un gen endógeno que codifica la proteína reguladora de señales alfa (SIRP α) en un mamífero no humano tal como un roedor (por ejemplo, un ratón). Se conoce que SIRP α humano existe en al menos 10 formas alélicas. Los métodos descritos en este ejemplo pueden emplearse para humanizar un gen de SIRP α endógeno de un animal no humano con el uso de cualquier alelo humano, o combinación de alelos humanos (o fragmentos de alelos) según convenga. En este ejemplo, la variante 1 de SIRP α humano se emplea para humanizar un gen endógeno de SIRP α de un ratón.

65

Un vector de transformación para la humanización de una región extracelular de un gen de SIRP α (por ejemplo, SIRP α) se construyó mediante el uso de la tecnología VELOCIGENE® (ver, por ejemplo, patente de los Estados Unidos núm. 6,586,251 y Valenzuela y otros (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659).

Brevemente, el clon de cromosoma artificial bacteriano (BAC) de ratón bMQ-261H14 se modificó para eliminar la secuencia que contiene los exones 2 a 4 de un gen de SIRP α endógeno e insertar los exones 2 a 4 de un gen de SIRP α humano mediante el uso del clon de BAC humano CTD-3035H21. El ADN genómico correspondiente a los exones 2 a 4 de un gen endógeno de SIRP α (~8555 pb) se reemplazó en el clon de BAC bMQ-261H14 con un fragmento de ADN de ~8581 pb que contiene los exones 2 a 4 de un gen de SIRP α humano del clon de BAC CTD-3035H21. El análisis de secuencia del alelo de SIRP α humano contenido en el clon CTD-3035H21 de BAC reveló que el alelo corresponde a la variante humana 1. Un casete de neomicina flanqueado por sitios loxP se añadió al extremo del fragmento de ADN humano de -8581 pb que contiene los exones 2 a 4 del gen de SIRP α humano (Figura 1).

Los brazos de homología corriente arriba y corriente abajo se obtuvieron a partir del ADN de BAC en ratón en las posiciones 5' y 3' de los exones 2 y 4, respectivamente, y se añadieron al casete de resistencia a neomicina-fragmento humano de 8581 pb para crear el vector de transformación final para la humanización de un gen endógeno de SIRP α , que contiene de 5' a 3' un brazo de homología en 5' que contiene 19 kb del ADN de ratón en 5' del exón 2 del gen endógeno de SIRP α , un fragmento de ADN de 8581 pb que contiene los exones 2 a 4 de un gen de SIRP α humano, un casete de resistencia a neomicina flanqueado por sitios loxP, y un brazo de homología en 3' que contiene 21 kb de ADN de ratón en 3' del exón 4 de un gen endógeno de SIRP α . La inserción dirigida del vector de transformación ubicó el casete de resistencia a neomicina en el quinto intrón de un gen de SIRP α de ratón entre los exones 4 y 5. El vector de transformación se linealizó mediante digestión con Swal y después se usó en la recombinación homóloga en células bacterianas para lograr un reemplazo dirigido de los exones 2 a 4 en un gen de SIRP α de ratón con los exones 2 a 4 de un gen de SIRP α humano (Figura 1).

El ADN de BAC transformado (descrito anteriormente) se usó para someter a electroporación las células ES de ratón para crear células ES modificadas que comprenden un reemplazo de los exones 2 a 4 en un gen endógeno de SIRP α de ratón con un fragmento genómico que comprende los exones 2 a 4 de un gen de SIRP α humano. Las células ES positivas que contienen un fragmento genómico que comprende los exones 2 a 4 de un gen de SIRP α humano se identificaron mediante PCR cuantitativa con el uso de sondas TAQMAN™ (Lie y Petropoulos, 1998. Curr. Opin. Biotechnology 9:43-48). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente arriba incluyó lo siguiente, que indica la secuencia endógena de ratón corriente arriba del punto de inserción (contenida dentro del paréntesis más abajo) unida de manera contigua a una secuencia genómica de SIRP α humana presente en el punto de inserción: (AGCTCTCCTA CCACTAGACT GCTGAGACCC GCTGCTCTGC TCAGGACTCG ATTTCCAGTA CACAATCTCC CTCTTTGAAA AGTACCACAC ATCCTGGGGT) GCTCTTGCAT TTGTGTGACA CTTTGCTAGC CAGGCTCAGT CCTGGGTTCC AGGTGGGGAC TCAAACACAC TGGCAGGAGT CTACATTGGA TATTCTTGGT (sec. con núm. de ident.: 6). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente abajo en el extremo 5' del casete de resistencia a neomicina incluyó lo siguiente, que indica una secuencia genómica de SIRP α humana contigua con la secuencia del casete corriente abajo del punto de inserción (contenida dentro del paréntesis más abajo con la secuencia loxP en letras cursivas): GTCCTCCATT CCTACTGGC CCAGCCCCTC TTCCCTACTC TTTCTAGCCC CTGCCTCATC TCCCTGGCTG CCATTGGGAG CCGCCCCAC TGGAAGCCAG (TCGAG ATAACCTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT ATGCATGGCC TCCGCGCCGG GTTTTGGCGC CTCCCGCGGG CGCCCCCTC CTCACGGCGA) (sec. con núm. de ident.: 7). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente abajo en el extremo 3' del casete de resistencia a neomicina incluyó lo siguiente, que indica la secuencia del casete contigua con la secuencia genómica de ratón en 3' del exón 4 de un gen endógeno de SIRP α (contenida dentro del paréntesis más abajo): CATTCTCAGT ATTGTTTTGC CAAGTTCTAA TTCCATCAGA CCTCGACCTG CAGCCCCTAG ATAACCTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG TTATGCTAGC (TGTCTCATAG AGGCTGGCGA TCTGGCTCAG GGACAGCCAG TACTGCAAAG AGTATCCTTG TTCATACCTT CTCCTAGTGG CCATCTCCCT GGGACAGTCA) (sec. con núm. de ident.: 8). Los clones de células ES positivas se usaron después para implantar en ratones hembras mediante el uso del método VELOCIMOUSE® (ver, por ejemplo, patente de los Estados Unidos núm. 7,294,754 y Poueymirou y otros 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) para generar una camada de crías que contienen una inserción de los exones 2 a 4 de un gen de SIRP α humano en un gen endógeno de SIRP α de un ratón.

Las células ES transformadas descritas anteriormente se usaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en etapa de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (más arriba). Los ratones que portan la humanización de los exones 2 a 4 de un gen endógeno de SIRP α se identificaron mediante genotipado con el uso de una modificación de un ensayo de alelos (Valenzuela y otros, más arriba) que detecta la presencia de las secuencias génicas de SIRP α humano.

Los ratones que portan la construcción del gen de SIRP α humanizado (es decir, que contienen los exones 2 a 4 de SIRP α humana en un gen de SIRP α de ratón) pueden cruzarse con una cepa de ratón Cre deletor (ver, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente Internacional núm. WO 2009/114400) para eliminar cualquier casete de

resistencia a neomicina con sitios lox introducidos por el vector de transformación que no se elimina, por ejemplo, en la etapa de célula ES o en el embrión. Opcionalmente, el casete de resistencia a neomicina se mantiene en los ratones.

- 5 Las crías se genotifican y una cría heterocigota para la construcción del gen de SIRP α humanizado se selecciona para su caracterización.

Ejemplo 2. Expresión de SIRP α humanizado en animales no humanos.

- 10 Este ejemplo ilustra la expresión característica de la proteína SIRP α en la superficie de células de animales no humanos diseñados genéticamente para contener una construcción del gen de SIRP α humanizado como se describe en el Ejemplo 1 en un locus endógeno de SIRP α .

- 15 Brevemente, los bazo se aislaron a partir de ratones de tipo silvestre (WT) y heterocigotos para un gen de SIRP α humanizado. Los bazo se perfundieron después con Colagenasa D (Roche Bioscience) y los eritrocitos se lisaron con tampón de lisis ACK de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La expresión en la superficie celular de SIRP α humano y de ratón se analizó mediante FACS con el uso de anticuerpos anti-CD3 (17A2), anti-CD19 (1D3), anti-CD11b (M1/70), anti-SIRP α humana (SE5A5), y anti-SIRP α de ratón (P84) conjugados con fluorocromo. La citometría de flujo se realizó mediante el uso de BD LSRFORTESSA™. La expresión ilustrativa de SIRP α humano y de ratón según se detectó en la superficie de monocitos CD11b+ se muestra en la Figura 2.

Como se muestra en la Figura 2, la expresión de SIRP α de ratón y humanizado pudo detectarse claramente en la superficie de monocitos CD11b+ de ratones heterocigotos.

- 25 Ejemplo 3. Injerto de células humanas en animales no humanos humanizados para SIRP.

Este ejemplo ilustra un injerto mejorado de células madre hematopoyéticas humanas en animales no humanos que tienen un gen de SIRP α humanizado.

- 30 Brevemente, los ratones Rag2 KO IL2R γ nulos con o sin un gen de SIRP α humanizado se llevaron a condiciones libres de patógenos. Los ratones recién nacidos (2 a 5 días de edad) se irradiaron con 240 cGy y se inyectaron de manera intrahepática con 1×10^5 células madre hematopoyéticas humanas CD34+. Se tomaron muestras de sangre de los ratones 10 a 12 semanas después del injerto y la sangre se analizó mediante FACS con el uso de anticuerpos anti-CD45 humano (HI30), anti-CD3 humano (SK7), anti-CD19 humano (HIB19) y anti-CD45 de ratón (30-F11) conjugados con fluorocromo para verificar la reconstitución del sistema inmunitario humano. El fondo genético de los ratones es BALB/cTa x 129/SvJae.

- 40 Los porcentajes ilustrativos de células CD34+ humanas en ratones de tipo silvestre, heterocigotos para SIRP α humanizado, ratones homocigotos para SIRP α humanizado y ratones BALB-Rag2 $^{-/-}$ IL2R γ $^{-/-}$ (DKO) se muestran en las Figuras 3 - 5.

Como se muestra en este ejemplo, los ratones homocigotos para un gen de SIRP α humanizado demuestran un injerto mejorado de células CD34+ humanas al proporcionar el mayor porcentaje de células CD34+ humanas en la periferia (por ejemplo, en sangre) en comparación con otras cepas analizadas.

- 45 En conjunto, estos datos demuestran que SIRP α humanizado es funcional en los ratones como se describe en la presente descripción a través de la expresión en la superficie de células en el ratón y ser capaz de sustentar el injerto de células madre hematopoyéticas CD34+ humanas.

- 50 Ejemplo 4. Evaluación de la eficacia del Ac 1 sobre el crecimiento tumoral de linfoma en células Raji en ratones BRG.

Sumario

- 55 El Ac 1 es un anticuerpo biespecífico (bsAc) que se une a CD3, un antígeno de células T asociado con el complejo del receptor de células T (TCR), y a CD20, un antígeno de la superficie de células B presente en células B normales y varios tumores malignos del linaje de células B. El Ac 1 está diseñado para unir las células que expresan CD20 con las células T citotóxicas mediante la unión a la subunidad CD3 del TCR, lo que resulta en la muerte de células T policlonales dirigida por CD20. CD20 es una diana validada clínicamente para la inmunoterapia; el anticuerpo quimérico rituximab está aprobado para el tratamiento de los linfomas no Hodgkin (NHL) y la leucemia linfocítica crónica (CLL). Aunque los pacientes pueden llegar a ser refractarios al rituximab, típicamente no se observa pérdida de la expresión de CD20. Por lo tanto, un anticuerpo biespecífico que una las células tumorales CD20 positivas con las células T citotóxicas representa una estrategia antitumoral potencial.

- 65 En este estudio, el efecto de tratamiento con el bsAc CD20xCD3 Ac 1 sobre el crecimiento tumoral de linfoma de células B humanas (Raji) se examinó en un modelo tumoral en ratón. El modelo utilizó ratones BALB/c-Rag2nulo

IL2 γ nulo (BRG) injertados con hCD34+ que se humanizaron para SIRP α . Estos ratones, con células T, B, y NK humanas, así como granulocitos, monocitos, y células dendríticas (DC), se trataron con Ac 1 dos veces a la semana, lo que dio como resultado una supresión significativa del crecimiento de tumores Raji en comparación con el control de vehículo y el AcM control de no unión, Ac 5 Control. El tratamiento con el Ac 1 suprimió el crecimiento tumoral a 0,4 mg/kg y 0,04 mg/kg con un mayor nivel de significación que el grupo control de vehículo a todo lo largo del período de tratamiento ($p < 0,0001$). No se observó una pérdida del peso significativa en ningún grupo de tratamiento. Estos resultados muestran que el Ac 1 se dirige a tumores Raji en ratones con células inmunitarias humanas, lo que da lugar a una supresión tumoral significativa.

10 Materiales y métodos

Materiales

Compuesto de prueba y anticuerpo control

15

Compuesto de prueba: Ac 1.

Anticuerpo control: Ac 5 Control.

20 Reactivos

Tabla 4: Lista de reactivos

Reactivo	Fuente	Identificación
Células Raji	Instalación central de Regeneron	Raji P 1-4-10 Pase núm. 4
Células madre hematopoyéticas (HSC) CD34+ humanas aisladas de hígados fetales humanos	Advanced Biosciences Resource, Inc.	
hPBMC	Reachbio	Catálogo núm. 0500-300, Lote núm. 130322
L-Histidina	Amresco	Catálogo núm. 181164-100G, Lote núm. 3363E344
Sacarosa	Biosolutions	Catálogo núm. BIO640-07, Lote núm. 0816012
RPMI	Irvine Scientific	Catálogo núm. 9160, Lote núm. 9160100803
FBS	Tissue Culture Biologicals	Catálogo núm. 101, Lote núm. 107062
Penicilina/Estreptomycin/L-Glutamina	Gibco	Catálogo núm. 10376-016, Lote núm. 1411480
2-Mercaptoetanol	Gibco	Catálogo núm. 21985-023, Lote núm. 762405
Anti-CD45 humano	Invitrogen	Catálogo núm. MHCD4518, Clon H130
Anti-NKp46 humano	BD Biosciences	Catálogo núm. 558051, Clon 9E2
Anti-CD 19 humano	BD Biosciences	Catálogo núm. 555412, Clon HIB19
Anti-CD3 humano	Invitrogen	Catálogo núm. MHCD0328, Clon S4.1
Anti-CD14 humano	BD Biosciences	Catálogo núm. 557742, Clon M5E2
Anti-CD45 humano	BD Biosciences	Catálogo núm. 557659, Clon 30-F11
BD Fortessa	BD Biosciences	Instrumento de orden especial

60 Sistemas de prueba

Los estudios en tumores presentados en este informe emplearon ratones inmunodeficientes BALB/c-Rag2nulos IL2 γ nulos (BRG) de 24-32 semanas de edad, machos y hembras, humanizados para el gen de la proteína reguladora de señales alfa (SIRP α). Estos se generaron en Regeneron mediante transformación de células madre embrionarias (ES) (Strowig y otros, Proc Natl Acad Sci USA, 108(32): 13218-13223 (2011)). Después del reconocimiento de CD47, SIRP α inhibe el aclaramiento de células CD47 positivas por los macrófagos. Estudios

65

anteriores han demostrado que los ratones BRG que expresan el transgén SIRP α humano tienen un injerto mejorado de HSC humanas (Strowig y otros, Proc Natl Acad Sci USA, 108(32): 13218-13223 (2011)).

Las crías BRG SIRP α recién nacidas se irradiaron e injertaron con células progenitoras hematopoyéticas hCD34+ derivadas de hígado fetal (Traggiai, y otros, Science, 304(5667): 104-107 (2004)). Estas HSC humanas dan lugar a células T, B, y NK humanas, así como a granulocitos, monocitos, y células dendríticas (DC). Debido a los bajos niveles de células B humanas circulantes, hay bajos niveles de IgG humana circulante. Además, estos ratones no desarrollan centros germinales, carecen de ganglios linfáticos y tienen una reposición limitada de células T y B si se agotan estas células. Los monocitos murinos, las DC, y los granulocitos continúan presentes también. La composición de células inmunitarias se confirmó mediante citometría de flujo de sangre, y los ratones se asignaron al azar por el % de injerto CD45 humano antes de su uso en los estudios de tumores. Los ratones se implantaron con células tumorales Raji en el Día 0, y se analizó la capacidad del Ac 1 para bloquear el crecimiento tumoral en 4 semanas. Los pesos corporales y los volúmenes tumorales se registraron en los días 3, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30 y 34 después de la implantación.

Diseño experimental

Reconstitución del sistema inmunitario humano en ratones BRG SIRP α

Los ratones BALB/c Rag2 $\gamma\text{-}\gamma\text{-}$ (BRG) con SIRP alfa humano (BRG SIRP α) inmunodeficientes se criaron en los aisladores libres de gérmenes en las instalaciones de animales de Regeneron. Los ratones neonatos se irradiaron con una dosis de 300 cGrey, 8-24 horas antes de la inyección de células madre hematopoyéticas (HSC) CD34+ humanas aisladas a partir de hígados fetales humanos. El injerto se dejó desarrollar durante 12-16 semanas y la cantidad de células injertadas se evaluó periódicamente mediante citometría de flujo. Durante toda la duración del experimento, los animales se alojaron en las instalaciones de animales de Regeneron en condiciones estándar en un ciclo día/noche de 12 horas con acceso a la comida y al agua ad libitum. La cantidad de animales por caja se limitó a un máximo de 5 ratones.

Se analizó la sangre de los ratones para determinar el por ciento de los niveles de injerto antes de iniciar el estudio. Se tomaron muestras de sangre completa en dos tubos capilares que contenían 150 μl de EDTA al 2 % (ácido etilendiaminotetraacético; 15 mg/ml). Los glóbulos rojos se lisaron mediante el uso del tampón de lisis ACK durante 3 minutos y el tampón se neutralizó con PBS (sin calcio ni magnesio). Las células se bloquearon con Bloqueo de Fc durante 5 minutos a 4 °C y después se tiñeron con CD45 humano, NKp46, CD19, CD3 y CD14 durante 30 minutos a 4 °C. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo con 5 láseres (BD Fortessa). El por ciento de injerto se determinó como el % de células CD45+ humanas de las células totales.

Procedimiento de estudio de tumores Raji en ratones BRG SIRP α

En el día 0, los grupos de 5 ratones BRG SIRP α recibieron la administración de 2×10^6 células tumorales Raji por vía subcutánea. El mismo día, los ratones se trataron con una dosis intraperitoneal (IP) de Ac 1 (0,4 o 0,04 mg/kg), Control de AcM control de no unión Ac 5 (que se une un antígeno felino sin reactividad cruzada con CD20 o CD3 humanos) a una dosis de 0,4 mg/kg o vehículo solo. Posteriormente los ratones recibieron dos dosis de anticuerpo/semana durante 4 semanas. El crecimiento tumoral se midió con calibres en los días 3, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30 y 34. Los grupos de estudio se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Resumen de los grupos de tratamiento en ratones BRG SIRP α

Grupos	Tumor	Anticuerpo	Dosis (mg/kg)	Vía	Programa	Cant. de ratones
Grupos control	Raji	Sin anticuerpo (Solo vehículo)	0	IP	2x/sem	5
	Raji	Ac 5 Control	0,4	IP	2x/sem	5
Grupos experimentales	Raji	Ac 1	0,4	IP	2x/sem	5
	Raji	Ac 1	0,04	IP	2x/sem	5

Procedimientos específicos

Preparación de reactivos

Cada uno del Ac 1 y el Ac 5 Control se diluyeron hasta la concentración deseada en vehículo (histidina 10 mM, 5 % de sacarosa, pH 5,8). Las células Raji se obtuvieron de la instalación central de Regeneron (pase 4) y se mantuvieron en medio de cultivo: RPMI 1640 +10 % FBS + Pen Strep-L-Glu + Mercaptoetanol. Las células Raji se diluyeron hasta la concentración deseada en medio.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante la utilización del programa GraphPad Prism 5.0 (Versión MacIntosh). El nivel de significación estadística se determinó mediante ANOVA de dos vías y posteriormente la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Los datos de cada una de las lecturas se compararon entre los grupos de tratamiento. Un umbral de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo, como se indica por *. Los ratones que murieron antes del final del estudio se eliminaron de los gráficos de las curvas de crecimiento tumoral combinadas (pero no de la curva de crecimiento de los ratones individuales) como se indica y el análisis estadístico para analizar mediante ANOVA de dos vías.

10 Resultados

El Ac 1 suprime el crecimiento de células tumorales Raji en ratones BRG SIRP α injertados con hCD34+

15 El Ac 1 suprimió el crecimiento de tumores Raji en comparación con el control de vehículo y el control de no unión en ratones BRG SIRP α injertados con hCD34+ (Figura 6). Las crías BRG SIRP α recién nacidas se irradiaron y se injertaron con células hepáticas fetales hCD34+ como células progenitoras hematopoyéticas (Traggiai, y otros, Science, 304(5667): 104-107 (2004)), lo que dio lugar a células T, B, y NK humanas, así como a granulocitos, monocitos, y DC. En el día 0, los ratones BRG SIRP α injertados con hCD34+ recibieron la administración de 2×10^6 células tumorales Raji por vía subcutánea. El mismo día, los ratones se trataron con una dosis intraperitoneal (IP) de Ac 1 (0,4 o 0,04 mg/kg) o el Control de AcM control de no unión Ac 5, o control de vehículo, seguido de dos dosis semanales a todo lo largo del estudio.

25 En comparación con los grupos control de vehículo y los grupos control de no unión, el Ac 1 suprimió significativamente el crecimiento de tumores Raji, administrado en dosis de 0,04 mg/kg ($p < 0,0001$) o 0,4 mg/kg ($p < 0,0001$) en el día 34 después de la implantación del tumor (Figura 7). Además, los efectos del tratamiento con el Ac 1 fueron dependientes de la dosis, donde el Ac 1 a 0,4 mg/kg suprimió el crecimiento completamente a todo lo largo del estudio, en comparación con el Ac 1 a 0,04 mg/kg, que suprimió el crecimiento tumoral completamente hacia el Día 30. Ni el Ac 1 ni el AcM control de no unión tuvieron un efecto significativo sobre el peso corporal de los ratones a todo lo largo del estudio (Figura 8).

30 Conclusión

35 El efecto del tratamiento con Ac1, un bsAc CD20xCD3, sobre el crecimiento de tumores Raji se examinó en un modelo de ratón. El Ac 1 fue eficaz en la supresión del crecimiento tumoral en ratones BRG SIRP α injertados con hCD34+ con células T, B, y NK humanas, así como granulocitos, monocitos, y DC. El tratamiento dos veces a la semana con Ac 1 dio como resultado una supresión significativa y dependiente de la dosis del crecimiento tumoral de linfoma de células B humanas Raji en comparación con el control de vehículo y el control de no unión. No se observó una pérdida del peso significativa en ningún grupo de tratamiento. Estos resultados muestran que el Ac 1 se dirige a tumores Raji en ratones con células inmunitarias humanas, lo que da lugar a una supresión significativa del crecimiento tumoral.

40 Equivalentes

45 Habiendo descrito así diversos aspectos de al menos una modalidad de esta invención, los expertos en la técnica apreciarán que pueden idear fácilmente diversas alteraciones, modificaciones, y mejoras. Tales alteraciones, modificaciones, y mejoras están destinadas a ser parte de esta descripción. En consecuencia, la descripción anterior y los dibujos son solo a manera de ejemplo.

50 El uso de términos ordinales tales como “primero”, “segundo”, “tercero”, etcétera, en las reivindicaciones para modificar un elemento de reivindicación no connota en sí mismo ninguna prioridad, precedencia, u orden de un elemento de reivindicación sobre otro o el orden temporal en que se realizan las acciones de un método, sino que se usan simplemente como etiquetas para distinguir un elemento de reivindicación que tiene un determinado nombre de otro elemento que tiene el mismo nombre (excepto por el uso del término ordinal) para distinguir los elementos de reivindicación.

55 Debe entenderse que los artículos “un” y “una” como se usan en la presente descripción en la especificación y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente de cualquier otra manera, incluyen los referentes plurales. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen “o” entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean, o son relevantes de cualquier otra manera en un producto o proceso determinado a menos que se indique lo contrario o resulte evidente de cualquier otra manera a partir del contexto. La invención incluye modalidades en las que exactamente un miembro del grupo está presente, se emplea, o es relevante de cualquier otra manera en un producto o proceso determinado. La invención incluye, además, modalidades en las que más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean, o son relevantes de cualquier otra manera en un producto o proceso determinado. Además, debe entenderse que la invención abarca todas las variaciones, combinaciones, y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etcétera, de una o más de las reivindicaciones

enumeradas se introducen en otra reivindicación dependiente de la misma reivindicación de base (o, según sea relevante, cualquier otra reivindicación) a menos que se indique de cualquier otra manera o a menos que resulte evidente a un experto en la técnica que podría surgir una contradicción o inconsistencia. Cuando los elementos se presentan en forma de listas (por ejemplo, en grupo Markush o un formato similar) debe entenderse que cada subgrupo de los elementos también se describe, y cualquier elemento(s) puede(n) eliminarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando la invención, o aspectos de la invención, se refiere(n) como que comprende(n) elementos, características particulares, etcétera, determinadas modalidades de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en tales elementos, características, etcétera. Con propósitos de simplicidad esas modalidades no se han expuesto específicamente en cada caso de manera explícita en la presente descripción. Debe entenderse que cualquier modalidad o aspecto de la invención puede excluirse explícitamente de las reivindicaciones, independientemente de si la exclusión específica se menciona en la especificación. Los expertos en la técnica apreciarán estándares de desviación o error típicos atribuibles a valores obtenidos en ensayos u otros procesos descritos en el presente documento. Las publicaciones, sitios web y otros materiales de referencia referidos en la presente descripción describen los antecedentes de la invención y proporcionan detalles adicionales relacionados con su práctica.

Listado de secuencias

[0145]

20

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc. Murphy, Andrew J.

<120> Animales no humanos que tienen un gen humanizado de una proteína reguladora de señales

25

<130> 31014 (3400P1)

<150> 61881261

<151> 2013-09-23

30

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

35

<210> 1

<211> 4007

<212> ADN

<213> Mus musculus

ES 2 624 614 T3

<400> 1

	gcgctoggcc gggccgccct cgcgctggcc tcgcgacggc tccgcacagc ccgcaactgc	60
5	tctgcgagct gtccccgctc gcgcttgctc tccgatctcc gtccccgctc cctctccctc	120
	ttcctctccc cctcttttct tctccctcgc tatccgctcc ccgcgccccg tgcctctggc	180
	tctgcgcctg gctccctcgg gtccgctccc ctttcccgcc ggcttgcccc ggcgtaacgc	240
10	tcccggagtc tccccgctcg gcggcgtctc attgtgggag ggggtcagat caccocgccg	300
	ggcggtgggc ctggggggca gcggaggggg aggggcctta gtcgttcgcc cgcgcccc	360
15	gcccgcctgc cgagcgcgct caccgcgct ctcctcctt gctctgcagc cgcggcccat	420
	ggagccccgc ggccccggcc ctggccgct agggccgctg ctgctctgcc tgctgctctc	480
	cgcgtcctgt ttctgtacag gagccacggg gaaggaactg aaggtgactc agcctgagaa	540
20	atcagtgtct gttgctgctg gggattogac cgttctgaac tgcactttga cctccttgtt	600
	gccggtggga cccattaggt ggtacagagg agtagggcca agccgctgt tgatctacag	660
	tttcgcagga gaatacgttc ctcgcaattag aatgtttca gataactacta agagaaacia	720
25	tatggacttt tccatccgta tcagtaatgt caccocagca gatgctggca tctactactg	780
	tgtgaagttc cagaaaggat catcagagcc tgacacagaa atacaatctg gagggggaac	840
30	agaggtctat gtactcgcca aaccttctcc accggaggta tccggcccag cagacagggg	900
	catacctgac cagaaagtga acttcacctg caagtctcat ggcttctctc cccggaatat	960
	caccctgaag tggttcaaag atgggcaaga actccacccc ttggagacca ccgtgaacco	1020
35	tagtgaaaag aatgtctcct acaacatctc cagcacagtc aggtggtac taaactccat	1080
	ggatgttaat tctaaggtca tctgcgaggt agcccacatc accttgata gaagccctct	1140
40	tcgtgggatt gctaacctgt ctaacttcat ccgagtttca cccaccgtga aggtcaccca	1200

ES 2 624 614 T3

acagtccccg acgtcaatga accaggtgaa cctcacctgc ogggctgaga ggttctaccc 1260
 cgaggatctc cagctgatct ggctggagaa tggaaacgta tcacggaatg acacgcccaa 1320
 5 gaatctcaca aagaacacgg atgggacctg taattacaca agcttgctcc tggatgaactc 1380
 atctgctcat agagaggacg tgggtgtcac gtgccaggtg aagcacgacc aacagccagc 1440
 gatcaccoga aaccataaccg tgctgggatt tgcccactcg agtgatcaag ggagcatgca 1500
 10 aaccttccct gataataatg ctaccacaaa ctggaatgct ttcctcgggtg tgggctggc 1560
 gtgtgctttg ctcgtagtcc tgctgatggc tgctctctac ctctccgga tcaaacagaa 1620
 15 gaaagccaag ggttcaacat cttccacacg gttgcacgag cccgagaaga acgcccagga 1680
 aataaccag atccaggaca caaatgacat caacgacatc acatacgag acctgaatct 1740
 gcccaagag aagaagcccg cccccgggc cctgagcct aacaaccaca cagaatatgc 1800
 20 aagcattgag acaggcaaag tgcctaggcc agaggatacc ctcacctatg ctgacctgga 1860
 catggtccac ctcagccggg cacagccagc cccaagcct gagccatctt tctcagagta 1920
 tgctagtgtc cagggtccaga ggaagtgaat ggggctgtgg tctgtactag gcccatccc 1980
 25 cacaagtttt cttgtcctac atggagtggc catgacgagg acatccagcc agccaatcct 2040
 gtccccagaa ggcaggtgg cacgggtcct aggaccaggg gtaagggtgg cctttgtctt 2100
 ccctccgtgg ctcttcaaca cctcttgggc acccacgtcc ccttcttccg gaggtgggt 2160
 30 gttgcagaac cagagggcga actggagaaa gctgctgga atccaagaag tgttgtgctt 2220
 oggcccatac ctggtgggtc tggatcctgg tcttggcaac cccaggttgc gtccttgatg 2280
 35 ttccagagct tggctctctg tgtggagaag agctcaccat ctctaccaa cttgagcttt 2340
 gggaccagac tccctttaga tcaaaccgcc ccatctgtgg aagaactaca ccagaagtca 2400
 gcaagttttc agccaacagt gctggcctcc ccacctcca ggctgactag ccctggggag 2460
 40 aaggaacctt ctctcctag accagcagag actccctggg catgttcagt gtggccccac 2520
 ctcccttcca gtcccagctt gcttctcca gctagcacta actcagcagc atcgtctgt 2580
 ggagcctgt aaattattga gaaatgtgaa ctgtgcagtc ttaaagctaa ggtgttagaa 2640
 45 aatttgattt atgctgttta gttgtgttg gtttctttt ctttttaatt tcttttctt 2700
 ttttgatttt ttttctttcc cttaaaacaa cagcagcagc atcttggtc tttgtcatgt 2760
 gttgaatggt tgggtcttgt gaagtctgag gtctaacagt ttattgtcct ggaaggattt 2820
 50 tcttacagca gaaacagatt ttttcaaat tcccagaatc ctgaggacca agaaggatcc 2880
 ctcagctgct acttccagca cccagcgtca ctgggacgaa ccaggccctg ttcttacaag 2940
 55 gccacatggc tggccctttg cctccatggc tactgtggta agtgcagcct tgtctgacct 3000
 aatgctgacc taatgttggc cattccacat tgaggggaca aggtcagtga tgccccctt 3060
 cactcacaag cacttcagag gcatgcagag agaagggaca ctggccagc tctctgaggt 3120
 60

ES 2 624 614 T3

aatcagtgca aggaggagtc cgttttttgc cagcaaacct cagcaggatc aactggaac 3180
 agaacctggt catacctgtg acaacacagc tgtgagccag ggcaaaccac ccaactgtcac 3240
 5 tggctcgaga gtctgggcag aggctctgac cctccaccct ttaaactgga tgccggggcc 3300
 tggctggggc caatgccaaag tggttatggc aacctgact atctggtctt aacatgtagc 3360
 10 tcaggaagtg gaggcgctaa tgtccccaat ccctggggat tcctgattcc agctattcat 3420
 gtaagcagag ccaacctgcc ttttctgta ggtgogactg ggatgtagg agcacagcaa 3480
 ggaccagct ctgtagggct ggtgacctga tacttctcat aatggcatct agaagttagg 3540
 15 ctgagttggc ctcaactggc cagcaaacca gaacttgtct ttgtccgggc catgttcttg 3600
 ggctgtcttc taattccaaa gggttggttg gtaaagctcc acccccttct cctctgccta 3660
 aagacatcac atgtgtatac acacacgggt gtatagatga gttaaagaa tgcctcgct 3720
 20 ggcatacctaa ttttgtctta agtttttttg gagggagaaa ggaacaaggc aagggaagat 3780
 gtgtagcttt ggctttaacc aggcagcctg ggggctccca agcctatgga accctggtac 3840
 25 aaagaagaga acagaagcgc cctgtgagga gtgggatttg ttttctgta gaccagatga 3900
 gaaggaaaca ggccctgttt tgtacatagt tgcaacttaa aatttttggc ttgcaaaata 3960
 tttttgtaat aaagatttct ggtaacaat aaaaaaaaaa aaaaaaa 4007

30

<210> 2
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35

<400> 2

40

Met Glu Pro Ala Gly Pro Ala Pro Gly Arg Leu Gly Pro Leu Leu Leu
 1 5 10 15

45

Cys Leu Leu Leu Ser Ala Ser Cys Phe Cys Thr Gly Ala Thr Gly Lys
 20 25 30

50

Glu Leu Lys Val Thr Gln Pro Glu Lys Ser Val Ser Val Ala Ala Gly
 35 40 45

55

Asp Ser Thr Val Leu Asn Cys Thr Leu Thr Ser Leu Leu Pro Val Gly
 50 55 60

60

Pro Ile Arg Trp Tyr Arg Gly Val Gly Pro Ser Arg Leu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80

Ser Phe Ala Gly Glu Tyr Val Pro Arg Ile Arg Asn Val Ser Asp Thr
 85 90 95

ES 2 624 614 T3

Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Ser Asn Val Thr
 100 105 110
 5 Pro Ala Asp Ala Gly Ile Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Gln Lys Gly Ser
 115 120 125
 10 Ser Glu Pro Asp Thr Glu Ile Gln Ser Gly Gly Gly Thr Glu Val Tyr
 130 135 140
 15 Val Leu Ala Lys Pro Ser Pro Pro Glu Val Ser Gly Pro Ala Asp Arg
 145 150 155 160
 20 Gly Ile Pro Asp Gln Lys Val Asn Phe Thr Cys Lys Ser His Gly Phe
 165 170 175
 25 Ser Pro Arg Asn Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asp Gly Gln Glu Leu
 180 185 190
 30 His Pro Leu Glu Thr Thr Val Asn Pro Ser Gly Lys Asn Val Ser Tyr
 195 200 205
 35 Asn Ile Ser Ser Thr Val Arg Val Val Leu Asn Ser Met Asp Val Asn
 210 215 220
 40 Ser Lys Val Ile Cys Glu Val Ala His Ile Thr Leu Asp Arg Ser Pro
 225 230 235 240
 45 Leu Arg Gly Ile Ala Asn Leu Ser Asn Phe Ile Arg Val Ser Pro Thr
 245 250 255
 50 Val Lys Val Thr Gln Gln Ser Pro Thr Ser Met Asn Gln Val Asn Leu
 260 265 270
 55 Thr Cys Arg Ala Glu Arg Phe Tyr Pro Glu Asp Leu Gln Leu Ile Trp
 275 280 285
 60 Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Asn Asp Thr Pro Lys Asn Leu Thr
 290 295 300
 65 Lys Asn Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Tyr Thr Ser Leu Phe Leu Val Asn
 305 310 315 320
 70 Ser Ser Ala His Arg Glu Asp Val Val Phe Thr Cys Gln Val Lys His
 325 330 335
 75 Asp Gln Gln Pro Ala Ile Thr Arg Asn His Thr Val Leu Gly Phe Ala
 340 345 350

ES 2 624 614 T3

5 His Ser Ser Asp Gln Gly Ser Met Gln Thr Phe Pro Asp Asn Asn Ala
 355 360 365

Thr His Asn Trp Asn Val Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Cys Ala Leu
 370 375 380

10 Leu Val Val Leu Leu Met Ala Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Ile Lys Gln
 385 390 395 400

15 Lys Lys Ala Lys Gly Ser Thr Ser Ser Thr Arg Leu His Glu Pro Glu
 405 410 415

Lys Asn Ala Arg Glu Ile Thr Gln Ile Gln Asp Thr Asn Asp Ile Asn
 420 425 430

20 Asp Ile Thr Tyr Ala Asp Leu Asn Leu Pro Lys Glu Lys Lys Pro Ala
 435 440 445

25 Pro Arg Ala Pro Glu Pro Asn Asn His Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Glu
 450 455 460

30 Thr Gly Lys Val Pro Arg Pro Glu Asp Thr Leu Thr Tyr Ala Asp Leu
 465 470 475 480

35 Asp Met Val His Leu Ser Arg Ala Gln Pro Ala Pro Lys Pro Glu Pro
 485 490 495

Ser Phe Ser Glu Tyr Ala Ser Val Gln Val Gln Arg Lys
 500 505

40 <210> 3
 <211> 4201
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

45 <400> 3

tccggcccgcc acccaccccc aagagggggcc ttcagctttg gggctcagag gcacgacctc 60

ctggggaggg ttaaaaggca gacgcccccc cgccccccgc gcccccgccg cccgactcct 120

50 tcgcccctc cagcctctcg ccagtgggaa gcggggagca gccgcgcggc cggagtccgg 180

aggcgagggg aggtcggccg caacttcccc ggtccacctt aagaggacga tgtagccagc 240

60 tcgcagcgct gaccttagaa aaacaagttt gcgcaaagtg gagcggggac ccggcctctg 300

ggcagccccg gcggcgcttc cagtgccttc cagccctcgc gggcggcgca gccgcggccc 360

atggagcccc ccggccccgc ccccggccgc ctcgggccgc tgctctgcct gctgctcgcc 420

60 gcgtcctgcg cctggtcagg agtggcgggt gaggaggagc tgcaggtgat tcagcctgac 480

ES 2 624 614 T3

5 aagtcctgtg tggttgcagc tggagagaca gccactctgc gctgcaactgc gacctctctg 540
atccctgtgg ggcccatcca gtggttcaga ggagctggac caggccggga attaacttac 600
aatcaaaaag aaggccactt cccccgggta acaactgttt cagacctcac aaagagaaac 660
10 aacatggact ttccatccg catcggtaac atcacccag cagatgccgg cacctactac 720
tgtgtgaagt tccgaaag gagccccgat gacgtggagt ttaagtctgg agcaggcaact 780
gagctgtctg tgcgogccaa accctctgcc cccgtggtat cgggccctgc ggcgagggcc 840
15 acacctcagc acacagtgag cttcacctgc gactcccagc gcttctcacc cagagacatc 900
accctgaaat ggttcaaaaa tgggaatgag ctctcagact tccagaccaa cgtggacccc 960
gtaggagaga gcgtgtccta cagcatccac agcacagcca aggtggtgct gacccgcgag 1020
20 gacgttcact ctcaagtcac ctgcgaggtg gccacgtca ccttgcaagg ggaccctctt 1080
cgtgggactg ccaacttgtc tgagaccatc cgagttccac ccaccttga ggttactcaa 1140
cagcccgtga ggcagagaa ccaggatgat gtcacctgcc aggtgaggaa gttctacccc 1200
25 cagagactac agctgacctg gttggagaat ggaaacgtgt cccggacaga aacggcctca 1260
accgttacag agaacaagga tggtagctac aactggatga gctggctcct ggtgaatgta 1320
30 tctgccaca gggatgatgt gaagctcacc tgccaggtgg agcatgacgg gcagccagcg 1380
gtcagcaaaa gccatgacct gaaggtctca gccacccga aggagcaggg ctcaaatacc 1440
gccgctgaga aactggatc taatgaacgg aacatctata ttgtggtggg tgtggtgtgc 1500
35 acctgctgg tggcctact gatggcggcc ctctacctg tccgaatcag acagaagaaa 1560
gccagggct ccaacttctc tacaaggtg catgagcccg agaagaatgc cagagaaata 1620
acacaggaca caaatgatat cacatatgca gacctgaacc tgcccaaggg gaagaagcct 1680
40 gctcccagg ctgaggagcc caacaaccac acggagtatg ccagcattca gaccagcccg 1740
cagcccggct cggaggacac cctcacctat gctgacctgg acatggtcca cctcaaccgg 1800
45 accccaagc agccggccc caagcctgag ccgtccttct cagagtacgc cagcgtccag 1860
gtcccagga agtgaatggg accgtggttt gctctagcac ccatctctac gcgctttctt 1920
gtcccacagg gagccggcgt gatgagcaca gccaaaccag ttcccggagg gctggggcgg 1980
50 tgcaggctct gggaccagg ggccaggggtg gctcttctct cccaccctc ccttggctct 2040
ccagcacttc ctgggcagcc acggccccct cccccacat tgccacatac ctggaggctg 2100
acgttgccaa accagccagg gaaccaacct gggagtggc cagaactgcc tggggtccaa 2160
55 gaactcttgt gcctcgtcc atcacatgt gggttttgaa gaccctcagc tgcctccccg 2220
atgctccgaa gcctgatctt ccagggtggg gaggagaaaa tccacctcc cctgacctcc 2280
accacctca ccaccaccac caccaccacc accaccacta ccaccaccac ccaactgggg 2340
60 ctagagtggg gaagatttcc cctttagatc aaactgcccc ttccatggaa aagctggaaa 2400

ES 2 624 614 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

aaaactctgg aacctatc caggcttggg gaggttgctg ccaacagtcc tggcctcccc 2460
 catccctagg ctaaagagcc atgagtcctg gaggaggaga ggaccctcc caaaggactg 2520
 gagacaaaac cctctgcttc cttgggtccc tccaagactc cctggggccc aactgtgttg 2580
 ctccacccgg acccatctct cccttctaga cctgagcttg ccctccagc tagcactaag 2640
 caacatctcg ctgtggacgc ctgtaaatta ctgagaaatg tgaaacgtgc aatcttgaaa 2700
 ctgaggtggt agaaaacttg atctgtgggt ttttgtttg tttttttct taaaacaaca 2760
 gcaacgtgat cttggctgtc tgtcatgtgt tgaagtccat ggttgggtct tgtgaagtct 2820
 gaggtttaac agtttgttgt cctggaggga tttcttaca gcgaagactt gagttcctcc 2880
 aagtcccaga accccaagaa tgggcaagaa ggatcagtc agccactccc tggagacaca 2940
 gccttctggc tgggactgac ttggccatgt tctcagctga gccacgcggc tggtagtgca 3000
 gccttctgtg accccgctgt ggtaagtcca gcctgccag ggctgctgag ggctgcctct 3060
 tgacagtgca gtcttatcga gacccaatgc ctcagctgc tcatccgtaa agtggggata 3120
 gtgaagatga caccctccc caccacctct cataagcact ttaggaacac acagagggta 3180
 gggatagtgg ccctggccgt ctatcctacc ccttagtga ccgccccat cccggtttc 3240
 tgagctgac cttgaagaag aaatcttcca tttctgctct caaacctac tgggatcaaa 3300
 ctggaataaa ttgaagacag ccaggggat ggtgcagctg tgaagctcg gctgattccc 3360
 cctctgtccc agaaggttg ccagaggggt tgaccagtt acccttaac cccaccctt 3420
 ccagtcgggt gtgagggcct gaccgggccc agggcaagca gatgtcgcaa gccctattta 3480
 ttcagtcttc actataactc ttagagttga gacgctaag ttcagtactc ctggccttgg 3540
 gatgcccaag ggatttctgg ctcaggctgt aaaagtagct gagccatcct gccattcct 3600
 ggaggtccta caggtgaaac tgcaggagct cagcatagac ccagctctct ggggatgggt 3660
 cacctggtga tttcaatgat ggcatccag aattagctga gccaacagac catgtggaca 3720
 gctttggcca gagctcccgt gtggcatctg ggagccacag tgaccagcc acctggctca 3780
 ggctagttcc aaattccaaa agattggctt gtaaaccctc gtctccctct cttttacca 3840
 gagacagcac atacgtgtgc acacgcatgc acacacacat tcagtatttt aaaagaatgt 3900
 tttcttgggt ccattttcat tttattttat ttttaattc ttggaggggg aaataagga 3960
 ataaggccaa ggaagatgta tagctttagc tttagcctgg caacctggag aatccacata 4020
 ccttgtgtat tgaaccccag gaaaaggaag aggtcgaacc aaccctgcgg aaggagcatg 4080
 gtttcaggag tttattttaa gactgctggg aaggaaacag gccccatttt gtatatagtt 4140
 gcaacttaaa ctttttggct tgcaaaatat ttttgtaata aagatttctg ggtaataatg 4200
 a 4201

ES 2 624 614 T3

<210> 4
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 4

Met Glu Pro Ala Gly Pro Ala Pro Gly Arg Leu Gly Pro Leu Leu Cys
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Ala Ala Ser Cys Ala Trp Ser Gly Val Ala Gly Glu Glu
 20 25 30
 Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala Ala Gly
 35 40 45
 Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro Val Gly
 50 55 60
 Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80
 Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser Asp Leu
 85 90 95
 Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn Ile Thr
 100 105 110
 Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys Gly Ser
 115 120 125
 Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser Val
 130 135 140
 Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala Arg Ala
 145 150 155 160
 Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly Phe Ser
 165 170 175
 Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Ser
 180 185 190
 Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser Tyr Ser
 195 200 205
 Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val His Ser
 210 215 220

ES 2 624 614 T3

5 Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp Pro Leu
 225 230 235 240
 Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro Thr Leu
 245 250 255
 10 Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn Val Thr
 260 265 270
 15 Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr Trp Leu
 275 280 285
 Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val Thr Glu
 290 295 300
 20 Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val Asn Val
 305 310 315 320
 25 Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu His Asp
 325 330 335
 30 Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser Ala His
 340 345 350
 Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly Ser Asn
 355 360 365
 35 Glu Arg Asn Ile Tyr Ile Val Val Gly Val Val Cys Thr Leu Leu Val
 370 375 380
 40 Ala Leu Leu Met Ala Ala Leu Tyr Leu Val Arg Ile Arg Gln Lys Lys
 385 390 395 400
 45 Ala Gln Gly Ser Thr Ser Ser Thr Arg Leu His Glu Pro Glu Lys Asn
 405 410 415
 Ala Arg Glu Ile Thr Gln Asp Thr Asn Asp Ile Thr Tyr Ala Asp Leu
 420 425 430
 50 Asn Leu Pro Lys Gly Lys Lys Pro Ala Pro Gln Ala Ala Glu Pro Asn
 435 440 445
 55 Asn His Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Gln Thr Ser Pro Gln Pro Ala Ser
 450 455 460
 60 Glu Asp Thr Leu Thr Tyr Ala Asp Leu Asp Met Val His Leu Asn Arg
 465 470 475 480
 Thr Pro Lys Gln Pro Ala Pro Lys Pro Glu Pro Ser Phe Ser Glu Tyr
 485 490 495
 65 Ala Ser Val Gln Val Pro Arg Lys
 500

ES 2 624 614 T3

<210> 5
 <211> 508
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 5

10	Met	Glu	Pro	Ala	Gly	Pro	Ala	Pro	Gly	Arg	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Leu
	1				5					10					15	
15	Cys	Leu	Leu	Leu	Ser	Ala	Ser	Cys	Phe	Cys	Thr	Gly	Val	Ala	Gly	Glu
				20					25					30		
20	Glu	Glu	Leu	Gln	Val	Ile	Gln	Pro	Asp	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Ala	Ala
			35					40					45			
25	Gly	Glu	Thr	Ala	Thr	Leu	Arg	Cys	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Ile	Pro	Val
		50					55					60				
30	Gly	Pro	Ile	Gln	Trp	Phe	Arg	Gly	Ala	Gly	Pro	Gly	Arg	Glu	Leu	Ile
	65					70					75					80
35	Tyr	Asn	Gln	Lys	Glu	Gly	His	Phe	Pro	Arg	Val	Thr	Thr	Val	Ser	Asp
					85					90					95	
40	Leu	Thr	Lys	Arg	Asn	Asn	Met	Asp	Phe	Ser	Ile	Arg	Ile	Gly	Asn	Ile
				100					105					110		
45	Thr	Pro	Ala	Asp	Ala	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Val	Lys	Phe	Arg	Lys	Gly
			115					120					125			
50	Ser	Pro	Asp	Asp	Val	Glu	Phe	Lys	Ser	Gly	Ala	Gly	Thr	Glu	Leu	Ser
		130					135					140				
55	Val	Arg	Ala	Lys	Pro	Ser	Ala	Pro	Val	Val	Ser	Gly	Pro	Ala	Ala	Arg
	145					150					155					160
60	Ala	Thr	Pro	Gln	His	Thr	Val	Ser	Phe	Thr	Cys	Glu	Ser	His	Gly	Phe
					165					170					175	
65	Ser	Pro	Arg	Asp	Ile	Thr	Leu	Lys	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu
				180					185					190		

ES 2 624 614 T3

Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser Tyr
 195 200 205
 5
 Ser Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val His
 210 215 220
 10
 Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp Pro
 225 230 235 240
 15
 Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro Thr
 245 250 255
 20
 Leu Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn Val
 260 265 270
 25
 Thr Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr Trp
 275 280 285
 30
 Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val Thr
 290 295 300
 35
 Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val Asn
 305 310 315 320
 Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu His
 325 330 335
 40
 Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser Ala
 340 345 350
 45
 His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Asp Asn Asn Ala Thr
 355 360 365
 50
 His Asn Trp Asn Val Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Cys Ala Leu Leu
 370 375 380
 Val Val Leu Leu Met Ala Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Ile Lys Gln Lys
 385 390 395 400
 55
 Lys Ala Lys Gly Ser Thr Ser Ser Thr Arg Leu His Glu Pro Glu Lys
 405 410 415
 60
 Asn Ala Arg Glu Ile Thr Gln Ile Gln Asp Thr Asn Asp Ile Asn Asp
 420 425 430
 Ile Thr Tyr Ala Asp Leu Asn Leu Pro Lys Glu Lys Lys Pro Ala Pro

ES 2 624 614 T3

	435		440		445												
5	Arg	Ala	Pro	Glu	Pro	Asn	Asn	His	Thr	Glu	Tyr	Ala	Ser	Ile	Glu	Thr	
	450					455						460					
10	Gly	Lys	Val	Pro	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	Tyr	Ala	Asp	Leu	Asp	
	465					470					475					480	
15	Met	Val	His	Leu	Ser	Arg	Ala	Gln	Pro	Ala	Pro	Lys	Pro	Glu	Pro	Ser	
					485					490						495	
20	Phe	Ser	Glu	Tyr	Ala	Ser	Val	Gln	Val	Gln	Arg	Lys					
			500					505									
20	<210> 6																
	<211> 200																
	<212> ADN																
	<213> Secuencia artificial																
25	<220>																
	<223> Oligonucleótido sintético																
	<400> 6																
30	agctctccta	ccactagact	gctgagacct		gctgctctgc		tcaggactcg		atttccagta		60						
	cacaatctcc	ctctttgaaa	agtaccacac		atcctggggg		gctcttgc		ttgtgtgaca		120						
	ctttgctagc	caggctcagt	cctgggttcc		aggtggggac		tcaaacacac		tggcaccgag		180						
35	ctacattgga	tattcttggt															200
40	<210> 7																
	<211> 199																
	<212> ADN																
	<213> Secuencia artificial																
45	<220>																
	<223> Oligonucleótido sintético																
	<400> 7																
50	gctccccatt	cctcactggc	ccagcccctc		ttccctactc		tttctagccc		ctgcctcctc		60						
	tccttggtg	ccattgggag	cctgccccac		tggaagccag		tcgagataac		ttcgtataat		120						
	gtatgctata	cgaagttata	tgcattggcct		ccgcgcccgg		ttttggcgcc		tcccgcgggc		180						
55	gccccctcc	tcacggcga															199
60	<210> 8																
	<211> 200																
	<212> ADN																
	<213> Secuencia artificial																
65	<220>																
	<223> Oligonucleótido sintético																

ES 2 624 614 T3

<400> 8

5	cattctcagt attgttttgc caagttctaa ttccatcaga cctcgacctg cagcccctag	60
	ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatgctagc tgtctcatag aggctggcga	120
10	tctggctcag ggacagccag tactgcaaag agtatccttg ttcatacctt ctctagtgg	180
	ccatctccct gggacagtca	200

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ratón cuyo genoma comprende un reemplazo de los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α de ratón en un locus endógeno de SIRP α de ratón con los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α humano para formar un gen de SIRP α humanizado, en donde dicho gen de SIRP α humanizado se une operativamente a un promotor de SIRP α de ratón en dicho locus endógeno de SIRP α de ratón, y expresa en dicho ratón una proteína SIRP α humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína SIRP α humana codificada por dicho gen de SIRP α humano y una porción intracelular de la proteína SIRP α de ratón codificada por dicho gen de SIRP α de ratón.
- 10 2. El ratón de conformidad con la reivindicación 1, en donde el gen de SIRP α humanizado comprende los exones 1, 5, 6, 7 y 8 de dicho gen de SIRP α de ratón.
- 15 3. El ratón de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha proteína SIRP α humana comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la sec. con núm. de ident.: 4.
- 20 4. El ratón de conformidad con la reivindicación 3, en donde dicha proteína SIRP α humanizada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la sec. con núm. de ident.: 5.
- 25 5. El ratón de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el ratón no expresa una proteína SIRP α de ratón.
- 30 6. El ratón de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicha proteína SIRP α humanizada se expresa en la superficie de las células en dicho ratón y apoya el injerto de células madre hematopoyéticas CD34+ humanas.
- 35 7. Una célula o tejido aislados de ratón cuyo genoma comprende un reemplazo de los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α de ratón en un locus endógeno de SIRP α de ratón con los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α humano para formar un gen de SIRP α humanizado, en donde dicho gen de SIRP α humanizado se une operativamente a un promotor de SIRP α de ratón en dicho locus endógeno de SIRP α de ratón, y codifica una proteína SIRP α humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína SIRP α humana codificada por dicho gen de SIRP α humano y una porción intracelular de la proteína SIRP α de ratón codificada por dicho gen de SIRP α de ratón.
- 40 8. La célula o tejido aislados de conformidad con la reivindicación 7, en donde el gen de SIRP α humanizado comprende los exones 1, 5, 6, 7 y 8 de dicho gen de SIRP α de ratón.
- 45 9. La célula o tejido aislados de conformidad con la reivindicación 7 u 8, en donde la célula o tejido no expresa una proteína SIRP α de ratón.
- 50 10. Un método para obtener un ratón, que comprende:
- 55 a) reemplazar los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α de ratón en un locus endógeno de SIRP α de ratón en una célula ES de ratón con los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α humano para formar un gen de SIRP α humanizado, en donde dicho gen de SIRP α humanizado se une operativamente a un promotor de SIRP α de ratón en dicho locus endógeno de SIRP α de ratón, y codifica una proteína SIRP α humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína SIRP α humana codificada por dicho gen de SIRP α humano y una porción intracelular de la proteína SIRP α de ratón codificada por dicho gen de SIRP α de ratón, para obtener de esta manera una célula ES modificada de ratón que comprende dicho gen de SIRP α humanizado; y
- 60 b) crear un ratón mediante el uso de la célula ES modificada obtenida en (a).
- 65 11. Un método para proporcionar un ratón transgénico, en donde una o más células humanas se trasplantan a un ratón de conformidad con las reivindicaciones 1-6.
12. El método de conformidad con la reivindicación 11, en donde las células humanas son células madre hematopoyéticas humanas.
13. Un método para medir la fagocitosis de un sustrato marcado por una o más células de ratón; el método comprende:
- a) proporcionar una o más células de ratón cuyo genoma comprende un reemplazo de los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α de ratón en un locus endógeno de SIRP α de ratón con los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α humano para formar un gen de SIRP α humanizado, en donde dicho gen de SIRP α humanizado se une operativamente a un promotor de SIRP α de ratón en dicho locus endógeno de SIRP α de ratón, y codifica una proteína SIRP α humanizada que comprende una porción extracelular

de la proteína SIRP α humana codificada por dicho gen de SIRP α humano y una porción intracelular de la proteína SIRP α de ratón codificada por dicho gen de SIRP α de ratón;

- b) incubar una o más células de la etapa (a) con el sustrato marcado; y
- c) medir la fagocitosis del sustrato marcado por una o más células de la etapa (b).

5

14. Un método para medir la fagocitosis de un antígeno por una o más células de un ratón, que comprende;

- a) proporcionar un ratón de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6;
- b) exponer el ratón al antígeno; y
- c) medir la fagocitosis del antígeno por una o más células del ratón.

10

15. Un método para evaluar la eficacia terapéutica de un fármaco para dirigirse a células humanas, que comprende:

- a) proporcionar un ratón de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el cual se han trasplantado una o más células humanas;
- b) administrar un candidato a fármaco a dicho ratón; y
- c) controlar las células humanas en el ratón para determinar la eficacia terapéutica del candidato a fármaco.

15

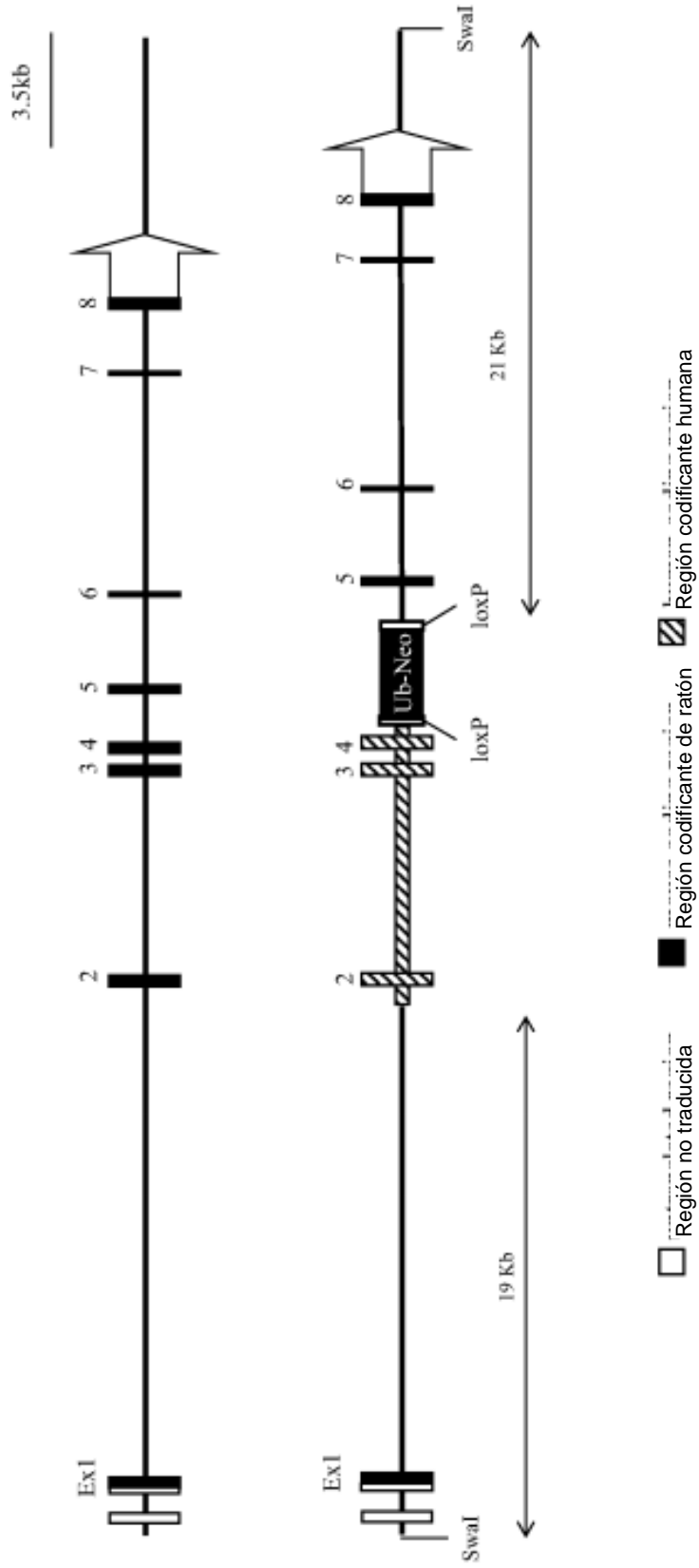


Figura 1

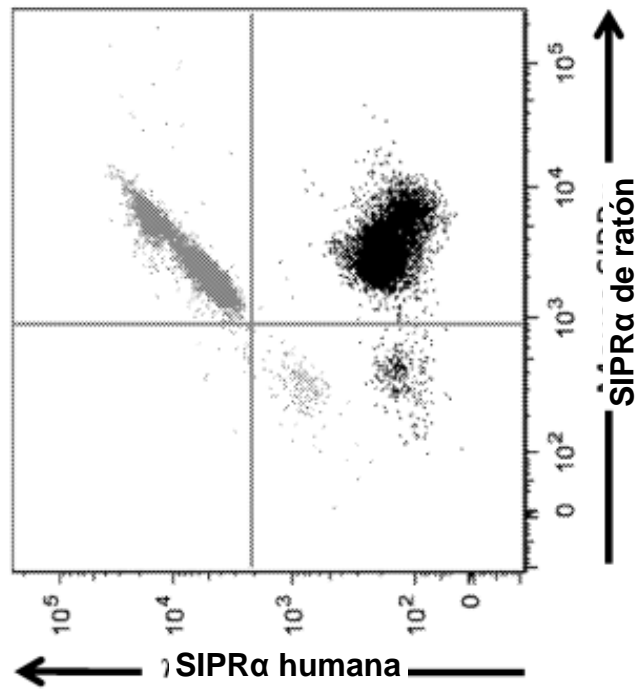


Figura 2

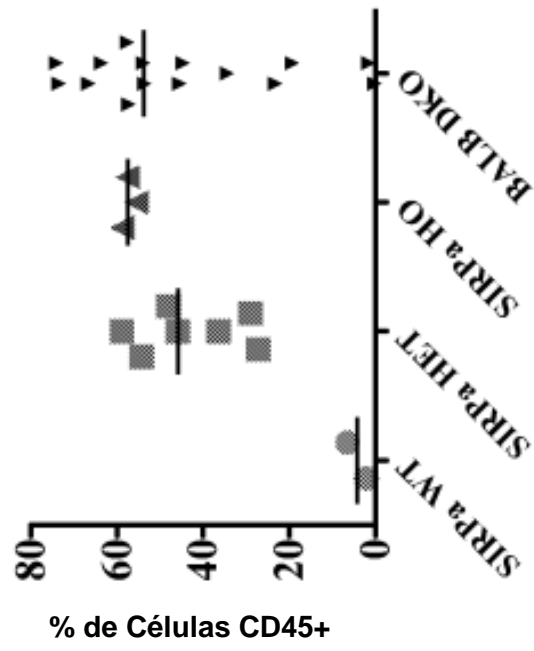


Figura 3

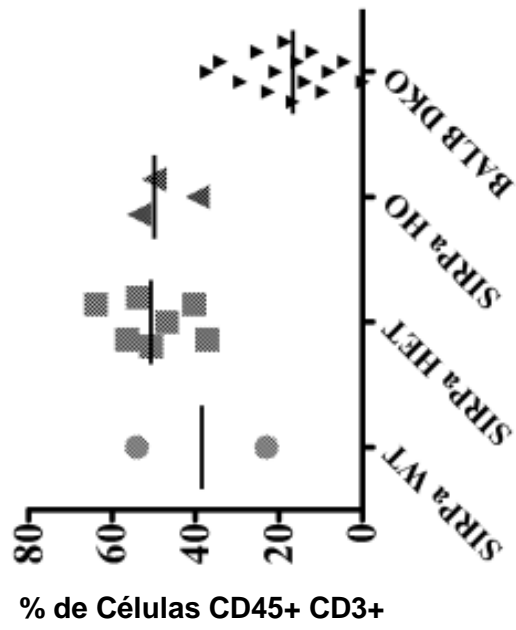


Figura 4

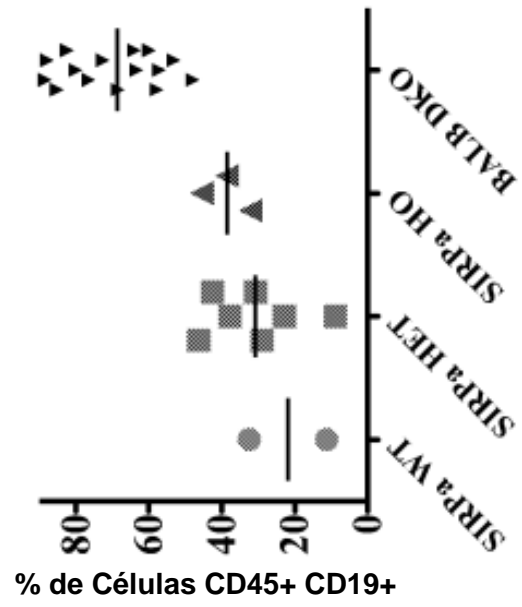


Figura 5

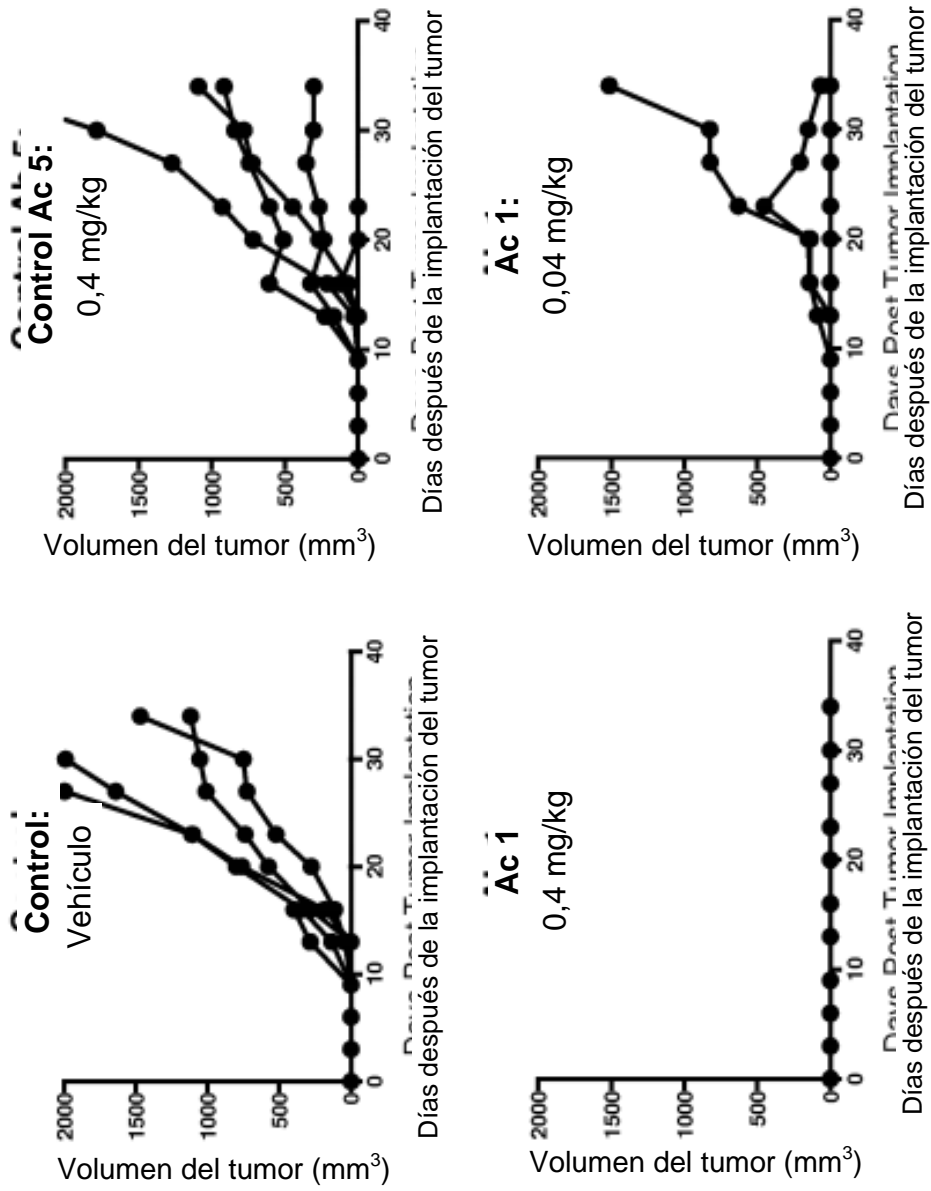


Figura 6

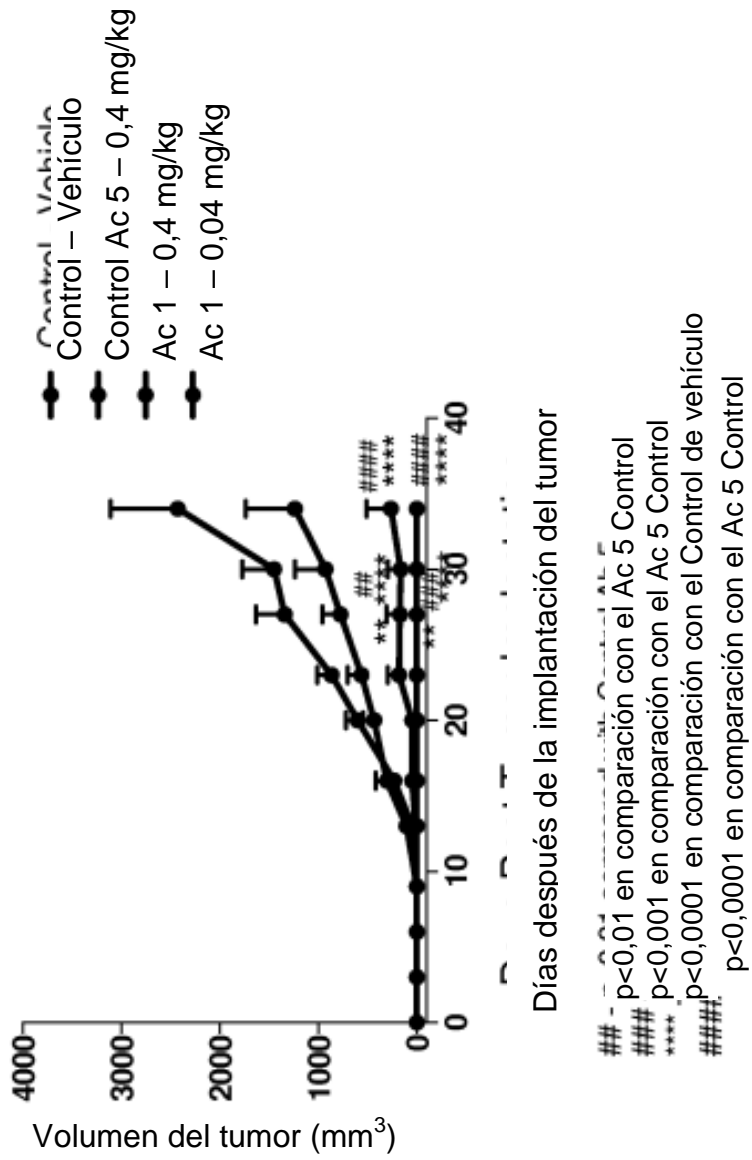


Figura 7

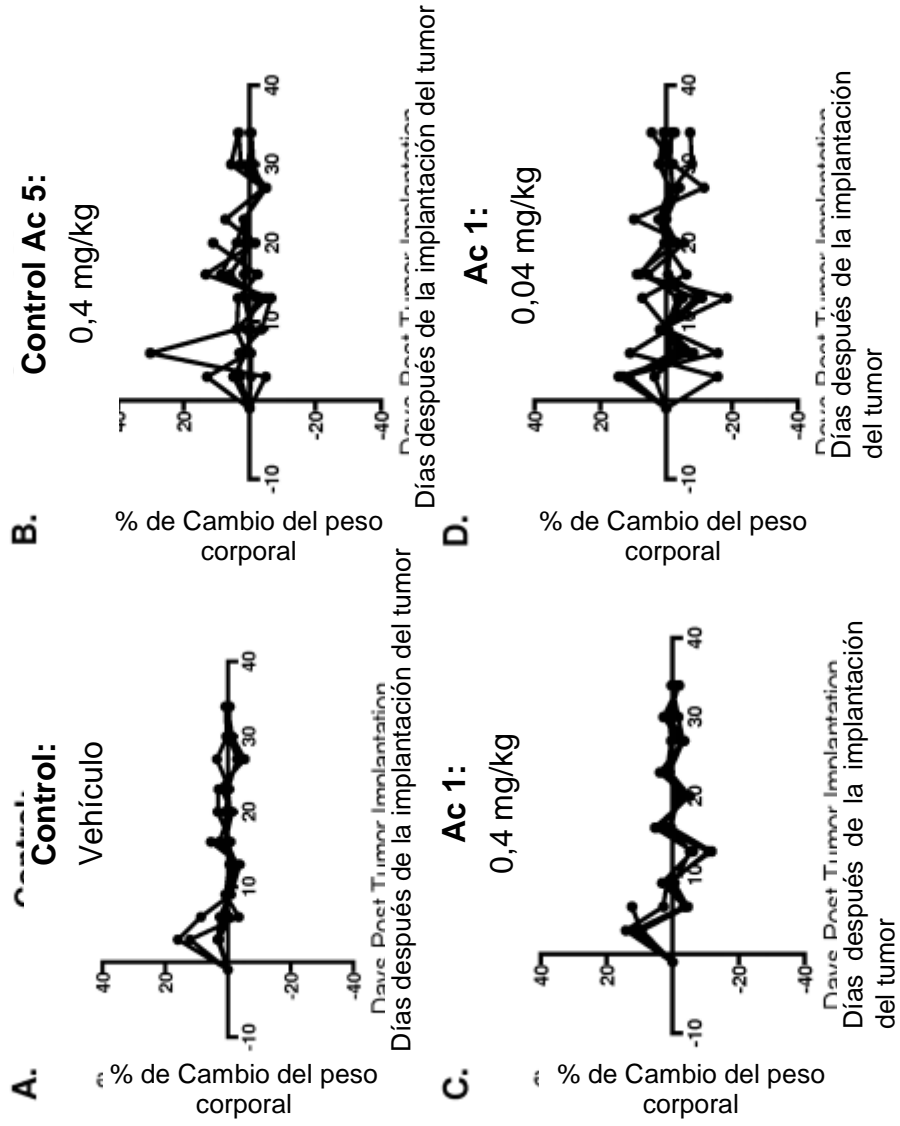


Figura 8