

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 529**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2015 PCT/US2015/029638**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15171861**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2015 E 15727106 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 3027015**

54 Título: **Animales con IL-4 e IL-4R alfa humanizadas**

30 Prioridad:

07.05.2014 US 201461989757 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WANG, LI-HSIEN;
XUE, YINGZI;
MURPHY, ANDREW J. y
STEVENS, SEAN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 656 529 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 con IL-4 e IL-4R alfa humanizadas

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 61/989,757, presentada el 7 de mayo de 2014.

10 Campo de la invención

En la presente descripción se describen animales no humanos que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína IL-4 y/o IL-4R α que comprende una secuencia humana. En la presente descripción se describen, además, animales transgénicos no humanos que comprenden un gen de IL-4 y/o IL-4R α que es humano en su totalidad o en parte. Se describen, además, animales no humanos que expresan proteínas IL-4 y/o IL-4R α humanas o humanizadas. Adicionalmente, se describen métodos para obtener y usar animales no humanos que comprenden secuencias de ácidos nucleicos de IL-4 y/o IL-4R α humanas o humanizadas.

20 Antecedentes de la invención

IL-4 e IL-4R α son objetivos terapéuticos para el tratamiento de una variedad de enfermedades, trastornos y afecciones humanas que se asocian con células T cooperadoras tipo 2 (Th2) anormales. La evaluación de la farmacocinética (PK) y la farmacodinámica (PD) de moléculas terapéuticas que se dirigen específicamente a las proteínas IL-4 humana o IL-4R α humana se realiza rutinariamente en animales no humanos, por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones o ratas. Sin embargo, la PD de tales moléculas terapéuticas no puede determinarse adecuadamente en ciertos animales no humanos porque estas moléculas terapéuticas no se dirigen a las proteínas IL-4 o IL-4R α endógenas.

30 Por otra parte, la evaluación de la eficacia terapéutica de antagonistas de las proteínas IL-4 e IL-4R α específicos de humanos mediante el uso de diversos modelos animales no humanos de las enfermedades asociadas con células Th2 anormales es problemática en animales no humanos en los que tales antagonistas específicos de la especie no interactúan con las proteínas IL-4 o IL-4R α endógenas.

35 En consecuencia, existe la necesidad de animales no humanos, por ejemplo, roedores, por ejemplo, animales murinos, por ejemplo, ratones o ratas, en los que los genes de IL-4 y/o IL-4R α del animal no humano se humanizan en su totalidad o en parte o se sustituyen (por ejemplo, en los loci endógenos no humanos) con los genes de IL-4 y/o IL-4R α humanos que comprenden secuencias que codifican proteínas IL-4 y/o IL-4R α humanas o humanizadas, respectivamente.

40 Además, existe la necesidad de animales no humanos que comprendan genes de IL-4 y/o IL-4R α (por ejemplo, humanizados, o humanos) en los que los genes de IL-4 y/o IL-4R α estén bajo el control de elementos reguladores no humanos (por ejemplo, elementos reguladores endógenos).

45 Además, existe la necesidad de animales no humanos humanizados que expresen una proteína IL-4 humana o humanizada en la sangre, el plasma o el suero a una concentración similar a la de la proteína IL-4 presente en la sangre, el plasma o el suero de un animal no humano de la misma edad que expresa una proteína IL-4 funcional, pero no comprende los genes de IL-4 humanos o humanizados, y/o expresa una proteína IL-4R α humana o humanizada en las células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, a un nivel similar al de la proteína IL-4R α en las células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, de un animal no humano de la misma edad que expresa una proteína IL-4R α funcional, pero no comprende el gen de IL-4R α humano o humanizado. La patente de los Estados Unidos US 2014/056920 A1 describe métodos para tratar o prevenir el asma mediante la administración de un antagonista de IL-4R.

55 Resumen de la invención

La presente invención proporciona un roedor, que comprende una sustitución de un fragmento genómico de un gen de IL-4R α de roedor en un locus endógeno de IL-4R α de roedor con un fragmento genómico de un gen de IL4-R α humano para formar un gen de IL4-R α humanizado que comprende el codón de iniciación ATG del exón codificante 1 hasta el exón codificante 5 del gen de IL-4R α humano, y los exones codificantes 6-9 del gen de IL-4R α de roedor, en donde el fragmento genómico del gen de IL-4R α de roedor comprende el codón de iniciación ATG del exón codificante 1 hasta el exón codificante 5 del gen de IL-4R α de roedor, y el fragmento genómico del gen de IL-4R α humano comprende el codón de iniciación ATG del exón codificante 1 hasta el exón codificante 5 del gen de IL-4R α humano, y en donde la expresión del gen de IL4-R α humanizado está bajo el control de elementos reguladores de IL-4R α de roedor en el locus endógeno de IL-4R α de roedor.

65

5 La invención proporciona, además, un método para obtener un roedor humanizado, que comprende sustituir un fragmento genómico de un gen de IL-4R α de roedor en un locus endógeno de IL-4R α de roedor con un fragmento genómico de un gen de IL-4R α humano para formar un gen de IL-4R α humanizado que comprende el codón de iniciación ATG del exón codificante 1 hasta el exón codificante 5 del gen de IL-4R α humano, y los exones codificantes 6-9 del gen de IL-4R α de roedor, en donde el fragmento genómico del gen de IL-4R α de roedor comprende el codón de iniciación ATG del exón codificante 1 hasta el exón codificante 5 del gen de IL-4R α de roedor, y el fragmento genómico del gen de IL-4R α humano comprende el codón de iniciación ATG del gen del exón codificante 1 hasta el exón codificante 5 del gen de IL-4R α humano, y el gen de IL-4R α humanizado se une operativamente a elementos reguladores de IL-4R α de roedor en el locus endógeno de IL-4R α de roedor.

10 La invención proporciona adicionalmente un método de tamizaje para un antagonista de IL-4 o IL-4R α específico de humanos, que comprende:

15 proporcionar un roedor doblemente humanizado para IL-4 e IL-4R α de la invención, en donde dicho roedor comprende un gen de IL-4R α humanizado de acuerdo con la invención y comprende, además, una sustitución de un fragmento genómico de un gen de IL-4 de roedor en un locus endógeno de IL-4 de roedor con un fragmento genómico de un gen de IL-4 humano para formar un gen de IL-4 humanizado, en donde el fragmento genómico del gen de IL-4 de roedor comprende el codón de iniciación ATG del exón 1 hasta el exón 4 del gen de IL-4 de roedor, y el fragmento genómico del gen de IL-4 humano comprende el codón de iniciación ATG del exón 1 hasta el exón 4 del gen de IL-4 humano, y en donde la expresión del gen de IL-4 humanizado está bajo el control de elementos reguladores de IL-4 de roedor en el locus endógeno de IL-4 de roedor,
 20 inducir una inflamación pulmonar en dicho roedor,
 administrar un agente a dicho roedor,
 25 determinar si la inflamación pulmonar se reduce por el agente, e identificar el agente como un antagonista de IL-4 o IL-4R α específico de humanos en base a su capacidad de reducir la inflamación pulmonar, en donde, opcionalmente, el grado de inflamación pulmonar se determina al medir la acumulación de moco en las vías respiratorias, células infiltrantes eosinófilas en un lavado broncoalveolar, y/o IgE circulante total.

30 La invención proporciona, además, un método de tamizaje para un antagonista de IL-4 o IL-4R α específico de humanos, que comprende:

proporcionar un roedor doblemente humanizado para IL-4 e IL-4R α de la invención,
 35 inducir una inflamación de la piel en dicho roedor,
 administrar un agente a dicho roedor,
 determinar si la inflamación de la piel se reduce por el agente, e identificar el agente como un antagonista de IL-4 o IL-4R α específico de humanos en base a su capacidad de reducir la inflamación de la piel.

Se describen en la presente animales no humanos que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína IL-4 y/o IL-4R α que comprende una secuencia humana.

40 Se describen en la presente animales transgénicos no humanos que comprenden un gen de IL-4 y/o IL-4R α que es humano en su totalidad o en parte.

Se describen en la presente, además, animales no humanos que expresan proteínas IL-4 y/o IL-4R α humanas o humanizadas.

45 Se describen en la presente animales no humanos que tienen una sustitución (en su totalidad o en parte) de los genes endógenos de IL-4 y/o IL-4R α del animal no humano.

50 Se describen en la presente animales no humanos que comprenden una humanización de IL-4 y/o IL-4R α (en su totalidad o en parte) en los loci endógenos de IL-4 y/o IL-4R α no humanos.

55 Se describen en la presente animales no humanos que tienen un gen de IL-4 humano o humanizado, en donde los animales no humanos no expresan una proteína IL-4 endógena, y en donde los animales no humanos expresan una proteína IL-4 humana o humanizada en la sangre, el plasma o el suero a una concentración similar a la de la proteína IL-4 presente en la sangre, el plasma o el suero de un animal no humano de la misma edad que expresa una proteína IL-4 endógena funcional, pero no comprende el gen de IL-4 humano o humanizado.

60 Se describen en la presente animales no humanos que tienen un gen de IL-4R α humano o humanizado, en donde los animales no humanos no expresan una proteína IL-4R α endógena, y expresan una proteína IL-4R α humana o humanizada en las células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, a un nivel similar al de la proteína IL-4R α presente en las células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, de un animal no humano de la misma edad que expresa una proteína IL-4R α endógena funcional, pero no comprende el gen de IL-4R α humano o humanizado.

65 En un aspecto, se describen en la presente animales no humanos que comprenden una secuencia de ácido nucleico de IL-4 y/o IL-4R α humanas o humanizadas.

- 5 En un aspecto, se describen en la presente animales no humanos modificados genéticamente que comprenden una sustitución en un locus endógeno de IL-4 y/o IL-4R α de un gen que codifica IL-4 y/o IL-4R α endógenas con un gen que codifica una proteína IL-4 y/o IL-4R α humanas o humanizadas. Se describen en la presente roedores, por ejemplo, ratones o ratas, que comprenden una sustitución de un gen endógeno de IL-4, en un locus endógeno de IL-4 de roedor, con un gen de IL-4 humano, y/o comprenden una sustitución de un gen endógeno de IL-4R α , en un locus endógeno de IL-4R α de roedor, con un gen de IL-4R α humano. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.
- 10 En un aspecto, se describen en la presente roedores modificados genéticamente, por ejemplo, ratones o ratas, que comprenden una humanización de un gen endógeno de IL-4 de roedor, en donde la humanización comprende una sustitución en un locus endógeno de IL-4 de roedor de un ácido nucleico de roedor que comprende al menos un exón de un gen de IL-4 de roedor con una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un exón de un gen de IL-4 humano para formar un gen de IL-4 modificado, en donde la expresión del gen de IL-4 modificado está bajo el control de elementos reguladores de roedor en el locus endógeno de IL-4 de roedor.
- 15 En un aspecto, el roedor es un ratón o una rata. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.
- 20 En un aspecto, el gen de IL-4 modificado codifica una proteína IL-4 humana o humanizada y comprende el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 4 del gen de IL-4 humano.
- En un aspecto, el roedor es un ratón que es incapaz de expresar una proteína IL-4 de ratón.
- 25 En un aspecto, el roedor es un ratón que expresa una proteína IL-4R α de ratón codificada por un gen endógeno de IL-4R α de ratón.
- En un aspecto, el roedor es un ratón que expresa una proteína IL-4R α humana o humanizada.
- 30 En un aspecto, la proteína IL-4R α humanizada comprende el ectodominio de una proteína IL-4R α humana.
- En un aspecto, la proteína IL-4R α humanizada comprende el dominio de transmembrana y el dominio citoplasmático de una proteína IL-4R α de ratón.
- 35 En un aspecto, el roedor es un ratón que comprende una sustitución en un locus endógeno de IL-4R α de ratón de un ácido nucleico de ratón que comprende al menos un exón de un gen de IL-4R α de ratón con una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un exón de un gen de IL-4R α humano para formar un gen de IL-4R α modificado, en donde la expresión del gen de IL-4R α modificado está bajo el control de elementos reguladores de ratón en el locus endógeno de IL-4R α de ratón.
- 40 En un aspecto, el roedor es un ratón, en donde un fragmento genómico contiguo de una secuencia de IL-4 de ratón que comprende el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 4 de la IL-4 de ratón se sustituye con un fragmento genómico contiguo de una secuencia de IL-4 humana que comprende el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 4 de la IL-4 humana.
- 45 En un aspecto, la expresión del gen de IL-4R α modificado que codifica la proteína IL-4R α humana o humanizada está bajo el control de elementos reguladores de ratón en el locus endógeno de IL-4R α de ratón.
- En un aspecto, se proporcionan roedores modificados genéticamente, por ejemplo, ratones o ratas, que comprenden una humanización de un gen endógeno de IL-4R α de roedor, en donde la humanización comprende una sustitución en un locus endógeno de IL-4R α de roedor de un ácido nucleico de roedor que comprende un exón de un gen de IL-4R α de roedor con una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un exón de un gen de IL-4R α humano para formar un gen de IL-4R α modificado (es decir, humanizado), en donde la expresión del gen de IL-4R α modificado, humanizado, está bajo el control de elementos reguladores de roedor en el locus endógeno de IL-4R α de roedor.
- 50 En un aspecto, el roedor es un ratón o una rata. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.
- 55 En un aspecto, el gen de IL-4R α modificado codifica una proteína IL-4R α humana o humanizada y comprende el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 5 del gen de IL-4R α humano.
- 60 En un aspecto, el roedor es un ratón que es incapaz de expresar una proteína IL-4R α de ratón.
- En un aspecto, el roedor es un ratón que expresa una proteína IL-4 de ratón codificada por un gen endógeno de IL-4 de ratón.
- 65

En un aspecto, el roedor es un ratón que expresa una proteína IL-4 humana o humanizada.

5 En un aspecto, el roedor es un ratón que comprende una sustitución en un locus endógeno de IL-4 de ratón de un ácido nucleico de ratón que comprende un exón de un gen de IL-4 de ratón con una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un exón de un gen de IL-4 humano para formar un gen de IL-4 modificado, en donde la expresión del gen de IL-4 modificado está bajo el control de elementos reguladores de ratón en el locus endógeno de IL-4 de ratón.

10 En un aspecto, el roedor es un ratón, y en donde un fragmento genómico contiguo de una secuencia de IL-4R α de ratón que comprende el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 5 de la IL-4R α de se sustituye con un fragmento genómico contiguo de una secuencia de IL-4R α humana que comprende el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 5 de la IL-4R α humana.

15 En un aspecto, se describen en la presente roedores modificados genéticamente, por ejemplo, un ratón o rata, que expresan una proteína IL-4 humana o humanizada, en donde el roedor que expresa una proteína IL-4 humana o humanizada comprende un sistema inmunológico normal, es decir, la cantidad de células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, en la sangre, el plasma o el suero del roedor que expresa una proteína IL-4 humana o humanizada es similar a la cantidad de células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, en la sangre, el plasma o el suero de un roedor que expresa una proteína IL-4 endógena funcional. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.

25 En un aspecto, se proporcionan roedores modificados genéticamente, por ejemplo, un ratón o rata, que expresan una proteína IL-4 a partir de un gen de IL-4 humano o humanizado, en donde el roedor expresa una proteína IL-4 humana o humanizada en su suero. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.

En un aspecto, el suero del roedor que expresa una proteína IL-4 humana o humanizada tiene aproximadamente el mismo nivel de proteína IL-4 que un roedor que expresa una proteína IL-4 endógena funcional, por ejemplo, un ratón o rata silvestre. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.

30 En un aspecto, el ratón expresa una proteína IL-4 humana o humanizada en el suero a una concentración de al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 % o 200 % del nivel de la proteína IL-4 presente en el suero de un ratón de la misma edad que expresa una proteína IL-4 endógena funcional, pero no comprende una sustitución de un gen endógeno de IL-4, en un locus endógeno de IL-4 de ratón, con un gen de IL-4 humano.

35 En un aspecto, el ratón expresa una proteína IL-4 humana o humanizada en el suero a una concentración de entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 200 %, entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 150 %, o entre aproximadamente 30 % y aproximadamente 100 % del nivel de la proteína IL-4 de ratón presente en el suero de un ratón de la misma edad que expresa una proteína IL-4 endógena funcional, pero no comprende una sustitución de un gen endógeno de IL-4, en un locus endógeno de IL-4 de ratón, con un gen de IL-4 humano.

40 En un aspecto, se proporcionan roedores modificados genéticamente, por ejemplo, un ratón o rata, que expresan una proteína IL-4R α humana o humanizada, en donde el roedor expresa una proteína IL-4R α humana o humanizada en las células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, a un nivel similar al de la proteína IL-4R α presente en las células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, de un roedor de la misma edad que expresa una proteína IL-4R α endógena funcional. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.

45 En un aspecto, se describen en la presente roedores modificados genéticamente, por ejemplo, un ratón o rata, que expresan una proteína IL-4R α a partir de un gen de IL-4R α humano, en donde el roedor expresa una proteína IL-4R α humana o humanizada en las células inmunológicas, por ejemplo, células B y T. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.

50 En un aspecto, las células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, del roedor que expresa una proteína IL-4R α humana o humanizada, tienen aproximadamente el mismo nivel de proteína IL-4R α en las células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, de un roedor que expresa una proteína IL-4R α endógena funcional, por ejemplo, un ratón o rata silvestre. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.

55 En un aspecto, el ratón expresa una proteína IL-4R α humana o humanizada en las células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, en una cantidad de al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 % o 200 % de la cantidad de proteína IL-4R α en las células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, de un ratón de la misma edad que expresa una proteína IL-4R α endógena funcional, pero no comprende una sustitución de un gen endógeno de IL-4R α , en un locus endógeno de IL-4R α de ratón, con un gen de IL-4R α humano.

60 En un aspecto, el ratón expresa una proteína IL-4R α humana o humanizada en las células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, en una cantidad de entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 200 %, entre

aproximadamente 20 % y aproximadamente 150 %, o entre aproximadamente 30 % y aproximadamente 100 % de la cantidad de proteína IL-4R α de ratón presente en las células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, de un ratón de la misma edad que expresa una proteína IL-4R α endógena funcional, pero no comprende una sustitución de un gen endógeno de IL-4R α , en un locus endógeno de IL-4R α de ratón, con un gen de IL-4R α humano.

5 En un aspecto, se describe en la presente un roedor modificado genéticamente, que comprende un gen de IL-4R α humanizado que comprende una sustitución de una secuencia que codifica el ectodominio de IL-4R α de roedor con una secuencia que codifica el ectodominio de IL-4R α humana, en donde el gen de IL-4R α humanizado comprende una secuencia de transmembrana de IL-4R α de roedor y una secuencia citoplasmática de IL-4R α de roedor, en
10 donde el gen de IL-4R α humanizado está bajo el control de elementos reguladores endógenos de IL-4R α de roedor en el locus endógeno de IL-4R α , y en donde el roedor comprende, además, un gen de IL-4 humanizado que codifica una proteína IL-4 humana o humanizada, en donde el gen de IL-4 humanizado está bajo el control de elementos reguladores endógenos de IL-4 de roedor en el locus endógeno de IL-4.

15 En un aspecto, el roedor es un ratón o una rata. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.

En un aspecto, el ratón es incapaz de expresar una proteína IL-4 de ratón e incapaz de expresar una proteína IL-4R α de ratón.

20 En un aspecto, las secuencias o elementos reguladores de roedor en el locus endógeno de IL-4 de roedor y/o el locus de IL-4R α de roedor son de un ratón o una rata.

En un aspecto, las secuencias o elementos reguladores de roedor son secuencias o elementos reguladores endógenos de roedor en el locus de IL-4 de roedor y/o el locus de IL-4R α de roedor.

25 En un aspecto, se describe en la presente un animal no humano, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata, que expresa proteínas IL-4 y/o IL-4R α humanas o humanizadas, en donde el animal no humano expresa proteínas IL-4 y/o IL-4R α humanas o humanizadas a partir de un locus endógeno de IL-4R α no humano y/o un locus endógeno de IL-4R α no humano. En un aspecto, el animal no humano es un roedor. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.

35 En un aspecto, se proporciona un ratón modificado genéticamente que expresa una proteína IL-4 humana o humanizada a partir de un locus endógeno de IL-4 de ratón, en donde el gen endógeno de IL-4 de ratón se ha sustituido, en su totalidad o en parte, con un gen de IL-4 humano.

40 En un aspecto, un ácido nucleico genómico contiguo de ratón de aproximadamente 6,3 kb en un locus endógeno de IL-4 de ratón, que incluye el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 4 (que incluye la región 3' no traducida) y una porción de la región en 3' corriente abajo del exón 4, se elimina y se sustituye con aproximadamente 8,8 kb de una secuencia de ácido nucleico de IL-4 humana que comprende el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 4 (que incluye la región 3' no traducida) y una porción de la región en 3' corriente abajo del exón 4 del gen de IL-4 humano. En un aspecto específico, la secuencia de ácido nucleico de IL-4 humana que sustituye al ácido nucleico genómico de ratón comprende el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 4 y una porción de la región en 3' corriente abajo del exón 4 del gen de IL-4 humano del BAC RP11-17K19 humano. En un aspecto específico, el gen de IL-4 modificado comprende los elementos reguladores en 5' de IL-4 de ratón y el exón 1 de IL-4 humano que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 4, es decir, las secuencias codificantes de la proteína IL-4.

50 En un aspecto, se describe en la presente un ratón modificado genéticamente que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína IL-4 humana o humanizada, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína IL-4 humana o humanizada sustituye, en su totalidad o en parte, una secuencia de nucleótidos endógena que codifica una proteína IL-4 endógena de ratón.

55 En un aspecto, se describe en la presente un ratón modificado genéticamente que expresa una proteína IL-4R α humana o humanizada a partir de un locus endógeno de IL-4R α de ratón, en donde el gen endógeno de IL-4R α de ratón se ha sustituido, en su totalidad o en parte, con un gen de IL-4R α humano.

60 En una modalidad, un ácido nucleico genómico contiguo de ratón de aproximadamente 7,1 kb en el locus endógeno de IL-4R α de ratón, que incluye el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 5 y una porción del intrón 5, se elimina y se sustituye con aproximadamente 15,6 kb de una secuencia de ácido nucleico de IL-4R α humana que comprende el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 5 y una porción del intrón 5 del gen de IL-4R α humano. En una modalidad específica, el ácido nucleico de IL-4 α humano que sustituye al ácido nucleico genómico de ratón comprende el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 5 y una porción del intrón 5 del gen de IL-4 α humano del BAC RP11-16E24 humano. En una modalidad específica, el ácido nucleico de IL-4R α humano que sustituye al ácido nucleico genómico de ratón comprende la totalidad de la secuencia codificante del ectodominio de IL-4R α humana.

5 En un aspecto, se describe en la presente un método para obtener un roedor con IL-4 humanizada, que comprende sustituir una secuencia génica de IL-4 de roedor que codifica una proteína IL-4 de roedor con una secuencia de ácido nucleico de IL-4 humana que comprende uno o más exones de la secuencia génica de IL-4 humana para formar un gen de IL-4 modificado, humanizado, que codifica una proteína IL-4 humana o humanizada, en donde la sustitución es en un locus endógeno de IL-4 de roedor y la secuencia génica de IL-4 humanizada que comprende uno o más exones de la secuencia génica de IL-4 humana y que codifica una proteína IL-4 humana o humanizada se une operativamente a secuencias o elementos reguladores de roedor (por ejemplo, elementos reguladores en 5' y/o 3') en el locus endógeno de IL-4 de roedor.

10 En un aspecto, el roedor es un ratón o una rata. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.

15 En un aspecto, las secuencias o elementos reguladores de roedor se derivan de un ratón. En un aspecto, las secuencias o elementos reguladores de roedor se derivan de una rata.

20 En un aspecto, las secuencias o elementos reguladores de roedor son secuencias o elementos reguladores endógenos de roedor en el locus de IL-4 de roedor. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.

25 En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de IL-4 humana que sustituye a la secuencia génica de IL-4 de roedor comprende al menos un exón de la secuencia génica de IL-4 humana. En otros aspectos, la secuencia de ácido nucleico de IL-4 humana que sustituye a la secuencia génica de IL-4 de roedor comprende al menos 2 o al menos 3 exones de la secuencia génica de IL-4 humana. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de IL-4 humana que sustituye a la secuencia génica de IL-4 de roedor comprende los 4 exones de la secuencia génica de IL-4 humana. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.

30 En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de IL-4 humana que sustituye a la secuencia génica de IL-4 de roedor codifica una proteína que es aproximadamente 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o aproximadamente 99 % idéntica a una IL-4 humana (por ejemplo, la proteína IL-4 humana codificada por el ácido nucleico que se expone en el núm. de registro del GenBank NM_000589.3s).

35 En un aspecto, la sustitución es en un locus endógeno de IL-4 de roedor y la secuencia génica de IL-4 humanizada que comprende uno o más exones de la secuencia génica de IL-4 humana y que codifica una proteína IL-4 humana o humanizada se une operativamente a secuencias o elementos reguladores endógenos de roedor (por ejemplo, elementos reguladores en 5' y/o 3') en el locus endógeno de IL-4 de roedor.

40 En un aspecto, se describe en la presente un método para obtener un ratón con IL-4 humanizada, que comprende sustituir una secuencia génica de IL-4 de ratón que codifica una proteína IL-4 de ratón con una secuencia génica de IL-4 humana para formar un gen de IL-4 modificado, humanizado, que codifica una proteína IL-4 humana o humanizada.

45 En un aspecto, la sustitución es en un locus endógeno de IL-4 de ratón, y el gen de IL-4 humanizado resultante que codifica una proteína IL-4 humana o humanizada se une operativamente a secuencias o elementos reguladores de ratón (por ejemplo, elementos reguladores en 5' y/o 3') en el locus endógeno de IL-4 de ratón.

50 En un aspecto, la sustitución es en un locus endógeno de IL-4 de ratón, y el gen de IL-4 humanizado que codifica una proteína IL-4 humana o humanizada se une operativamente a secuencias o elementos reguladores endógenos de ratón (por ejemplo, elementos reguladores en 5' y/o 3') en el locus endógeno de IL-4 de ratón.

55 En un aspecto, se describe en la presente un método para obtener un roedor con IL-4R α humanizada, que comprende sustituir una secuencia génica de IL-4R α de roedor que codifica una proteína IL-4R α de roedor con una secuencia de ácido nucleico de IL-4R α humana que comprende uno o más exones de la secuencia génica de IL-4R α humana para formar un gen de IL-4R α modificado, humanizado, que codifica una proteína IL-4R α humana o humanizada, en donde la sustitución es en un locus endógeno de IL-4R α de roedor y la secuencia génica de IL-4R α humanizada que comprende uno o más exones de la secuencia génica de IL-4R α humana y que codifica una proteína IL-4R α humana o humanizada se une operativamente a secuencias o elementos reguladores de roedor (por ejemplo, elementos reguladores en 5' y/o 3') en el locus endógeno de IL-4R α de roedor.

60 En un aspecto, el roedor es un ratón o una rata. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.

65 En un aspecto, las secuencias o elementos reguladores de roedor se derivan de un ratón. En un aspecto, las secuencias o elementos reguladores de roedor se derivan de una rata.

En un aspecto, las secuencias o elementos reguladores de roedor son secuencias o elementos reguladores endógenos de roedor en el locus de IL-4R α de roedor. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.

5 En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de IL-4R α humana que sustituye a la secuencia génica de IL-4R α de roedor comprende al menos un exón de la secuencia génica de IL-4R α humana. En otros aspectos, la secuencia de ácido nucleico de IL-4R α humana que sustituye a la secuencia génica de IL-4R α de roedor comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 exones de la secuencia génica de IL-4R α humana. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de IL-4R α humana que sustituye a la secuencia génica de IL-4R α de roedor comprende los 9 exones de la secuencia
10 génica de IL-4R α humana. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.

En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de IL-4R α humana que sustituye a la secuencia génica de IL-4R α de roedor codifica una proteína que es aproximadamente 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o aproximadamente 99 % idéntica a una IL-4R α humana (por ejemplo, la proteína IL-4R α humana codificada por el ácido nucleico que se
15 expone en el núm. de registro del GenBank NM_000418.3).

En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de IL-4R α humana que sustituye a la secuencia génica de IL-4R α de roedor comprende al menos un exón de la secuencia génica de IL-4R α humana que codifica el ectodominio de la
20 proteína IL-4R α humana. En otros aspectos, la secuencia de ácido nucleico de IL-4R α humana que sustituye a la secuencia génica de IL-4R α de roedor comprende al menos 2, 3, o 4 exones de la secuencia génica de IL-4R α humana que codifica el ectodominio de la proteína IL-4R α humana. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de IL-4R α humana que sustituye a la secuencia génica de IL-4R α de roedor comprende los 5 exones de la secuencia génica de IL-4R α humana que codifica el ectodominio de la proteína IL-4R α humana. En un aspecto, el
25 roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.

En un aspecto, la secuencia génica de IL-4R α humana o humanizada que sustituye a la secuencia génica de IL-4R α de roedor codifica un ectodominio de la proteína IL-4R α que es aproximadamente 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98
30 %, o aproximadamente 99 % idéntica al ectodominio de una proteína IL-4R α humana (por ejemplo, la proteína IL-4R α humana codificada por el ácido nucleico que se expone en el núm. de registro del GenBank NM_000418.3).

En un aspecto, la sustitución es en un locus endógeno de IL-4R α de roedor y la secuencia génica de IL-4R α humanizada que comprende uno o más exones de la secuencia génica de IL-4R α humana y que codifica una
35 proteína IL-4R α humana o humanizada se une operativamente a secuencias o elementos reguladores endógenos de roedor (por ejemplo, elementos reguladores en 5' y/o 3') en el locus endógeno de IL-4R α de roedor.

En un aspecto, se describe en la presente un método para obtener un ratón con IL-4R α humanizada, que comprende sustituir una secuencia génica de IL-4R α de ratón que codifica una proteína IL-4R α de ratón con una
40 secuencia de ácido nucleico de IL-4R α humana para formar un gen de IL-4R α humanizado que codifica una proteína IL-4R α humana o humanizada.

En un aspecto, la sustitución es en un locus endógeno de IL-4R α de ratón, y el gen de IL-4R α humanizado que codifica una proteína IL-4R α humana o humanizada se une operativamente a secuencias o elementos reguladores
45 de ratón (por ejemplo, elementos reguladores en 5' y/o 3') en el locus endógeno de IL-4R α de ratón.

En un aspecto, la sustitución es en un locus endógeno de IL-4R α de ratón, y el gen de IL-4R α humanizado que codifica una proteína IL-4R α humana o humanizada se une operativamente a secuencias o elementos reguladores
50 endógenos de ratón (por ejemplo, elementos reguladores en 5' y/o 3') en el locus endógeno de IL-4R α de ratón.

En diversos aspectos, los animales no humanos modificados genéticamente, por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones o ratas, descritos en la presente descripción comprenden las modificaciones genéticas en su línea germinal.

En un aspecto, se describe en la presente un embrión de un animal no humano, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o rata, que comprende una modificación genética como se describe en la presente descripción.

55 En un aspecto, se describe en la presente un embrión huésped de un animal no humano, por ejemplo, un roedor, p. ej. un ratón o rata, que comprende una célula donante que comprende una modificación genética como se describe en la presente descripción.

En un aspecto, se describe en la presente una célula pluripotente o totipotente de un animal no humano, por
60 ejemplo, un roedor, por ejemplo, ratón o rata, que comprende una modificación genética como se describe en la presente descripción. En un aspecto, la célula es una célula de roedor. En un aspecto, la célula es una célula de ratón. En un aspecto, la célula es una célula ES de roedor. En un aspecto, la célula es una célula ES de ratón.

En un aspecto, se describe en la presente un huevo de un animal no humano, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, ratón o rata, en donde el huevo del animal no humano comprende un cromosoma ectópico de animal no humano, en donde el cromosoma ectópico de animal no humano comprende una modificación genética como se describe en la
65

presente descripción. En un aspecto, el animal no humano es un roedor. En un aspecto, el roedor es un ratón. En un aspecto, el roedor es una rata.

En un aspecto, el embrión, huevo, o célula de ratón que se modifica genéticamente para comprender un gen de IL-4 humano o un gen de IL-4R α humano es de un ratón 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 otro aspecto, el ratón 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, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (ver, por ejemplo, Festing y otros (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836, ver además, Auerbach y otros (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines). En un aspecto específico, el ratón modificado genéticamente es una mezcla de una cepa 129 mencionada anteriormente y una cepa C57BL/6 mencionada anteriormente. En otro aspecto específico, el ratón es una mezcla de las cepas 129 mencionadas anteriormente, o una mezcla de las cepas BL/6 mencionadas anteriormente. En un aspecto específico, la cepa 129 de la mezcla es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En otro aspecto, el ratón es una cepa BALB, por ejemplo, una cepa BALB/c. En aún otro aspecto, el ratón es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa mencionada anteriormente. En un aspecto, el ratón es un ratón Swiss o Swiss Webster.

En diversos aspectos, los animales no humanos que comprenden una secuencia de ácido nucleico de IL-4R y/o IL-4 humana o humanizada se seleccionan de mamíferos y aves. En un aspecto, los animales no humanos son mamíferos. En un aspecto, los mamíferos son murinos.

En un aspecto, se describe en la presente un método de tamizaje para un antagonista de IL-4 o IL-4R α específico de humanos. El método es útil para identificar candidatos terapéuticos y evaluar su eficacia terapéutica. El método comprende administrar un agente a un roedor modificado genéticamente que se humaniza doblemente para IL-4 e IL-4R α como se describe en la presente descripción, determinar un efecto del agente sobre una función biológica mediada por la vía de señalización IL-4/IL-4R α , e identificar el agente como una antagonista de IL-4 o IL-4R α específico de humanos si antagoniza la función mediada por la vía de señalización IL-4/IL-4R α en el roedor modificado genéticamente.

En un aspecto, el agente comprende un dominio variable inmunoglobulínico que se une a IL-4 o IL-4R α . En un aspecto, el agente se une específicamente a IL-4 o IL-4R α humanas, pero no a IL-4 o IL-4R α de roedor. En un aspecto, el agente es un anticuerpo. En un aspecto específico, el agente es un anticuerpo que se une específicamente a la IL-4R α humana, pero no a la IL-4R α de roedor.

En un aspecto, el método de tamizaje utiliza un ratón doblemente humanizado que expresa una proteína IL-4 humana, y una proteína IL-4R α humanizada, en donde la proteína IL-4R α humanizada incluye el ectodominio de una proteína IL-4R α humana, unido a los dominios de transmembrana y citoplasmático de la proteína IL-4R α endógena de ratón, y en donde el ratón no expresa IL-4 murina o IL-4R α murino.

En algunos aspectos, el método de tamizaje incluye las etapas de inducir en un roedor doblemente humanizado como se describe en la presente descripción una enfermedad asociada con la señalización IL-4/IL-4R α , administrar un agente al roedor, determinar si el agente mejora la enfermedad, e identificar el agente como un antagonista de IL-4 o IL-4R α específico de humanos, adecuado para tratar la enfermedad si el agente mejora la enfermedad.

En algunos aspectos, la enfermedad asociada con la señalización IL-4/IL-4R α es una inflamación de las vías respiratorias, que puede inducirse en un roedor mediante la administración intranasal de un alérgeno (por ejemplo, extracto de ácaros del polvo doméstico) en una o más dosis durante un período de tiempo. El efecto de un agente puede determinarse al medir si el grado de inflamación de las vías respiratorias (que se refleja, por ejemplo, por la acumulación de moco, la infiltración de células en un lavado broncoalveolar, y/o los niveles de IgE circulante total), se reduce como resultado de la administración del agente.

En algunos aspectos, la enfermedad asociada con la señalización IL-4/IL-4R α es inflamación de la piel o dermatitis atópica, que pueden inducirse en un roedor al crear un daño en la piel y exponer la piel lesionada a un alérgeno (por ejemplo, una toxina bacteriana o un extracto de ácaros del polvo doméstico) en una o más dosis durante un período de tiempo. El efecto de un agente puede determinarse al medir si la inflamación de la piel se reduce como resultado de la administración del agente.

En un aspecto adicional, un animal no humano triplemente humanizado, cuyos genes de IL-4, IL-4R α , e IL-33 se han humanizado como se describe en la presente descripción, se usa para evaluar la farmacodinámica (PD) y la eficacia terapéutica de un compuesto o una combinación de compuestos.

Es posible utilizar en conjunto cada uno de los aspectos y modalidades descritos en la presente descripción, a menos que se excluyan explícitamente o evidentemente a partir del contexto de la modalidad o aspecto.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 proporciona una ilustración, no a escala, de los receptores para la transducción de señales de IL-4 e IL-13 y el mecanismo de acción de dupilumab, un anticuerpo monoclonal neutralizante completamente humano que se une específicamente a la cadena α del receptor de IL-4 humano (IL-4R α).

Las Figuras 2A-2B proporcionan una ilustración, no a escala, de las estrategias para la humanización de los loci de IL-4 (*Il4*) e IL-4R α (*Il4ra*). (2A) El gen de IL-4 de ratón (parte superior) que abarca la región codificante a partir del exón 1 que comienza en el codón de iniciación ATG hasta el exón 4 (que incluye la región 3' no traducida) y una porción de la región en 3' corriente abajo del exón 4, se elimina y se sustituye por la región codificante a partir del exón 1 que comienza en el codón ATG hasta el exón 4 (que incluye la región 3' no traducida) y una porción de la región en 3' corriente abajo del exón 4 del gen de IL-4 humano (parte inferior) junto con un casete de selección con el gen *hygro* flanqueado por sitios loxP, como se indica. (2B) El gen de IL-4R α de ratón (parte superior) que abarca la región codificante desde el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 5 y una porción del intrón 5 se elimina y se sustituye por la región codificante desde el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 5 y una porción del intrón 5 del gen de IL-4R α humano (parte inferior) y un casete de selección con el gen *neo* flanqueado por sitios loxP, como se indica.

La Figura 3 muestra la expresión de una proteína IL-4R α humanizada en células B y T de ratones doblemente humanizados para IL-4/IL-4R α (Il4^{hu/hu}/Il4ra^{hu/hu}).

La Figura 4 muestra las especificidades de los ligandos IL-4 e IL-13 y las funcionalidades de los receptores mediante el uso de células primarias derivadas de ratones con IL4R α humanizada (Il4ra^{hu/hu}).

La Figura 5 muestra la producción de IgE dependiente de IL-4 *in vivo* en ratones silvestres, pero no en ratones con IL4R α humanizada (Il4ra^{hu/hu}).

La Figura 6 muestra que la inducción dependiente de la dosis de IL-4, de la producción de mIgE *ex vivo* en células B de ratón (panel izquierdo) se bloquea por dupilumab, en una manera dependiente de la dosis (panel derecho).

La Figura 7 muestra que dupilumab, en una manera dependiente de la dosis, previene patologías pulmonares inducidas por IL-25 *in vivo* en ratones con IL4R α humanizada (Il4ra^{hu/hu}).

La Figura 8 muestra el diseño experimental para evaluar la eficacia terapéutica de dupilumab en un modelo de inflamación pulmonar inducida por un extracto de ácaros del polvo doméstico (HDM) mediante el uso de ratones doblemente humanizados para IL-4 e IL-4R α (IL-4^{hu/hu}/IL-4R^{hu/hu}). "REGN668" se refiere a un anticuerpo monoclonal humano dirigido a IL-4R α humana, conocido además como dupilumab. "REGN129" se refiere a una IL-13R α 2-Fc sol de ratón, que es una proteína de fusión entre el ectodominio de IL-13R α 2 de ratón y Fc.

La Figura 9 muestra el diseño experimental para evaluar la eficacia terapéutica de dupilumab en un modelo de inflamación pulmonar inducida por HDM mediante el uso de ratones doblemente humanizados para IL-4 e IL-4R α (IL-4^{hu/hu}/IL-4R^{hu/hu}) y un anticuerpo de control de isotipo.

Las Figuras 10A-10C ilustran las estrategias para la humanización del locus de IL-33 de ratón. La Figura 10A ilustra que el gen de IL-33 de ratón (parte superior) que abarca la región codificante desde el exón 2 que comienza en el codón de iniciación ATG hasta el codón de parada en el exón 8 se elimina y se sustituye por la región codificante desde el exón 2 que comienza en el codón ATG hasta el exón 8 (que incluye la región 3' no traducida) del gen de IL-33 humano (parte inferior). La Figura 10B muestra el alelo de IL-33 humanizado en un clon de células ES de ratón MAID 7060, que contiene un casete de selección para la neomicina con loxP. La Figura 10C muestra el alelo de IL-33 humanizado en un clon de células ES de ratón MAID 7061, en donde el casete de selección para la neomicina se ha eliminado, y los sitios de clonación y loxP (77 pb) se conservan corriente abajo de la secuencia de IL-33 humana, y la región UTR 3' de ratón se conserva corriente abajo del sitio loxP.

Descripción detallada de la invención

IL-4 e IL-4R α como objetivos terapéuticos

Los trastornos alérgicos son un grupo de enfermedades que se están presentando a un ritmo creciente, especialmente en países desarrollados. La dermatitis atópica, el asma, y la rinitis alérgica son las afecciones inflamatorias más comunes entre los pacientes con alergias; estos pacientes sufren frecuentemente de la aparición de múltiples síntomas clínicos. La patogénesis de la alergia se asocia con respuestas inmunitarias anómalas contra antígenos exógenos (ver Mueller y otros (2002) Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system, *Biochim Biophys Acta* 1592:237-250).

La sobreproducción de IgE específica del antígeno es un componente esencial para desencadenar la inflamación alérgica. La polarización de células T cooperadoras tipo 2 (Th2) anormales contribuye al aumento de las respuestas de IgE.

La interleucina-4 (IL-4) y la interleucina-13 (IL-13), identificadas originalmente en células T activadas, son las principales citocinas de Th2 que desempeñan papeles centrales en la iniciación y el mantenimiento de las reacciones inmunológicas e inflamatorias en las alergias.

5 La señalización de IL-4 e IL-13 está mediada por dos complejos de receptores distintos con una subunidad compartida, la subunidad alfa del receptor de IL-4 (IL-4R α), que puede contribuir a las respuestas biológicas traslapadas entre estas dos citocinas. Ver la Figura 1.

10 *Receptores para la transducción de señales de interleucina-4/13 y el mecanismo de acción de dupilumab.* El receptor IL-4R α forma dos complejos de receptores heterodiméricos distintos para mediar las funciones biológicas de la IL-4 y la IL-13 en una manera específica del tejido y de la respuesta. El receptor tipo I compuesto de IL-4R α y la cadena gamma común de los receptores de citocinas (γ C) es único para la IL-4. El receptor tipo II formado entre
15 IL-4R α e IL-13R α 1 es el receptor primario para la IL-13, pero además es funcional para la IL-4. Adicionalmente, la IL-13 se unirá a un segundo receptor de alta afinidad, IL-13R α 2, que generalmente se reconoce como un receptor señuelo o con un posible efecto profibrótico en la forma de longitud completa.

Dupilumab es un anticuerpo monoclonal antagonista contra la proteína IL-4R α humana que inhibe las actividades biológicas inducidas por IL-4 e IL-13. Dupilumab bloquea la transducción de señales de IL-4 ya que impide su unión a las subunidades del receptor, mientras que el efecto inhibitor sobre la señalización de IL-13 probablemente está mediado a través de la interferencia con la interacción del receptor dimérico.

20 Dupilumab, un anticuerpo monoclonal completamente humano dirigido contra la subunidad de IL-4R α compartida, se desarrolló en Regeneron Pharmaceuticals, Inc. mediante el uso de ratones VelocImmune®. Dupilumab está en la etapa de ensayos clínicos para el tratamiento del asma moderada a grave y para el tratamiento de la dermatitis atópica moderada a grave.

La evaluación de la potencia de dupilumab en modelos murinos presenta múltiples desafíos: (a) dupilumab no reconoce el receptor de IL-4 de ratón cognado; y (b) hay una falta de interacción funcional entre la proteína IL-4 de
30 ratón y el receptor de IL-4 humano.

El gen y la proteína de IL-4

El gen de IL-4 codifica una proteína IL-4 secretada, que desempeña un papel importante en la activación de las células B, así como otros tipos celulares (ver la Figura 1).

IL-4 humana. Ident. del gen en NCBI: 3565; Fuente primaria: HGNC:6014; RefSeq del transcrito: NM_000589.3; Ident. en UniProt: P05112; Ensamblaje genómico: GRCh37; Ubicación: chr5:132,009,743-132,018,576 cadena +.

40 El gen de IL-4 humano se ubica en el cromosoma 5, en 5q31.1. El gen de IL-4 humano tiene 4 exones y codifica un polipéptido precursor de 153 aminoácidos de longitud, que incluye un péptido señal de 24 aminoácidos, y una proteína IL-4 madura de 129 aminoácidos.

45 *IL-4 de ratón.* Ident. del gen en NCBI: 16189; Fuente primaria: MGI:96556; RefSeq del transcrito: NM_021283.2; Ident. en UniProt: P07750; Ensamblaje genómico: GRCm38; Ubicación: chr11:53,612,350-53,618,606 cadena -.

El gen de IL-4 de ratón se ubica en el cromosoma 11, en 11 31,97 cM. El gen de IL-4 de ratón tiene 4 exones y codifica un polipéptido precursor de 140 aminoácidos de longitud, que incluye un péptido señal de 20 aminoácidos, y una proteína IL-4 madura de 120 aminoácidos.

El gen y la proteína de IL-4R α

El gen de IL-4R α codifica la proteína IL-4R α que es un receptor de transmembrana, el cual se expresa primariamente en células B y T, y es un receptor para las proteínas IL-4 e IL-13 (ver la Figura 1).

55 *IL-4R α humana.* Ident. del gen en NCBI: 3566; Fuente primaria: MGI:6015; RefSeq del transcrito: NM_000418.3; Ident. en UniProt: P24394; Ensamblaje genómico: GRCh37; Ubicación: chr16:27,351,525-27,367,111 cadena +.

60 El gen de IL-4R α humano se ubica en el cromosoma 16 en 16p12.1-p11.2. El gen de IL-4R α humano tiene 9 exones codificantes y codifica un polipéptido precursor de 825 aminoácidos, que incluye un péptido señal de 25 aminoácidos, y una proteína IL-4R α madura de 800 aminoácidos, donde los primeros 207 residuos de aminoácidos de la proteína madura constituyen el dominio extracelular. El dominio extracelular (es decir, el ectodominio) de la proteína IL-4R α humana se codifica por los exones codificantes del 1 al 5 del gen de IL-4R α humano.

IL-4Rα de ratón. Ident. del gen en NCBI: 16190; Fuente primaria: MGI:105367; RefSeq del transcrito: NM_001008700.3; Ident. en UniProt: P16382; Ensamblaje genómico: GRCm38; Ubicación: chr11:125,565,655-125,572,745 cadena +.

5 El gen de IL-4Rα de ratón se ubica en el cromosoma 7 en 7 68,94 cM. El gen de IL-4Rα de ratón tiene 9 exones codificantes y codifica un polipéptido precursor de 810 aminoácidos, que incluye un péptido señal de 25 aminoácidos, y una proteína IL-4Rα madura de 785 aminoácidos, donde los primeros 208 residuos de aminoácidos de la proteína madura constituyen el dominio extracelular. El dominio extracelular (es decir, el ectodominio) de la proteína IL-4Rα de ratón se codifica por los exones codificantes del 1 al 5 del gen de IL-4Rα de ratón.

10 Especificidad de especie de las proteínas IL-4 e IL-4Rα

Como se muestra en la presente descripción, la IL-4 de ratón, pero no la humana, es funcional en ratones silvestres, y, por el contrario, la IL-4 humana, pero no la de ratón, es funcional en ratones con IL-4Rα (*Il4ra^{hu/hu}*). (Ver además, por ejemplo, Andrews y otros (2001) Reconstitution of a functional human type II IL-4/IL-13 receptor in mouse B cells: demonstration of species specificity, J Immunol. 166:1716-1722)

Especificidad de especie de los inhibidores de IL-4 e IL-4Rα humanas

20 La farmacocinética (PK) y farmacodinámica (PD) de las moléculas terapéuticas candidatas que se dirigen a las proteínas IL-4 o IL-4Rα se evalúan típicamente en animales no humanos, por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones o ratas. Tales moléculas terapéuticas se analizan, además, para determinar la eficacia terapéutica *in vivo* en modelos animales no humanos, por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratón o rata, de enfermedades, trastornos y afecciones humanas asociados con las células Th2 anormales.

25 Sin embargo, las moléculas terapéuticas que son específicas para las proteínas IL-4 o IL-4Rα humanas, por ejemplo, inhibidores de IL-4 o IL-4Rα específicos de humanos, no pueden evaluarse adecuadamente para determinar la PD o la eficacia terapéutica *in vivo* en roedores, en particular ratones, porque los objetivos de estas moléculas terapéuticas están ausentes. Este problema no se supera con el uso de animales transgénicos no humanos, por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones o ratas, que expresen proteínas IL-4 o IL-4Rα humanas debido a la especificidad de especie mencionada anteriormente de la proteína IL-4.

30 En consecuencia, en varios aspectos, para evaluar la PD y la eficacia terapéutica *in vivo* de un antagonista o inhibidor de las proteínas IL-4 o IL-4Rα, específico de humanos, en animales no humanos, por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones o ratas, es conveniente sustituir las proteínas IL-4 y/o IL-4Rα endógenas con proteínas IL-4 y/o IL-4Rα humanas.

35 Además, en varios aspectos, para evitar problemas potenciales de sobreexpresión o subexpresión de las proteínas IL-4 y/o IL-4Rα humanas, es conveniente insertar los genes de IL-4 y/o IL-4Rα humanos en el genoma de los animales no humanos, por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones o ratas, en los loci de los genes endógenos de IL-4 y/o IL-4Rα, y expresar las proteínas IL-4 y/o IL-4Rα humanas en animales no humanos, por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones o ratas, bajo el control, al menos en parte, de los elementos reguladores endógenos de IL-4 y/o IL-4Rα.

45 Animales no humanos modificados genéticamente

En la presente descripción se describen animales no humanos modificados genéticamente cuyo gen endógeno de IL-4 y/o el gen endógeno de IL-4Rα se han sustituido en su totalidad o en parte, en un locus endógeno de IL-4 y/o el locus endógeno de IL-4Rα, con un ácido nucleico de IL-4 humano y/o un ácido nucleico de IL-4Rα humano para formar un gen de IL-4 modificado y/o un gen de IL-4Rα modificado que codifica una proteína IL-4 humana o humanizada y/o IL-4Rα humana o humanizada.

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 algunos aspectos, el animal no humano es un mamífero. En modalidades específicas, el animal no humano es un roedor tal como una rata o un ratón.

55 En un aspecto, se describen en la presente roedores modificados genéticamente, por ejemplo, ratones o ratas, cuyo gen endógeno de IL-4 de roedor se ha sustituido en su totalidad o en parte, en un locus endógeno de IL-4, con un ácido nucleico de IL-4 humano.

60 La sustitución implica una sustitución de al menos un exón, es decir, uno o más exones, de un gen de IL-4 de roedor, con un ácido nucleico humano que comprende al menos un exón de un gen de IL-4 humano. En algunos aspectos, un fragmento genómico contiguo de roedor que incluye el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 4 de un gen de IL-4 de roedor se ha sustituido con un fragmento genómico contiguo humano que incluye el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 4 de un gen de IL-4 humano. En un aspecto específico, el roedor es un ratón, y un fragmento genómico contiguo de ratón de

aproximadamente 6,3 kb en un locus endógeno de IL-4 de ratón, que incluye el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 4 (que incluye la región 3' no traducida) y una porción de la región en 3' corriente abajo del exón 4, se elimina y se sustituye con aproximadamente 8,8 kb de una secuencia de ácido nucleico de IL-4 humana que comprende el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 4 (que incluye la región 3' no traducida) y una porción de la región en 3' corriente abajo del exón 4 del gen de IL-4 humano.

En algunos aspectos, la sustitución da como resultado un gen de IL-4 modificado, humanizado, en un locus endógeno del gen de IL-4, en donde la expresión del gen de IL-4 modificado está bajo el control de elementos reguladores endógenos en el locus endógeno de IL-4. El término "elementos reguladores" como se usa en la presente descripción se refiere a secuencias reguladoras de la transcripción, que incluyen las secuencias reguladoras de la transcripción en 5' tales como elementos promotores, potenciadores, y supresores, y las secuencias reguladoras de la transcripción en 3' tal como una secuencia de terminación de la transcripción. En algunos aspectos, la expresión de un gen de IL-4 modificado está bajo el control de elementos reguladores endógenos en 5'. En otros aspectos, la expresión de un gen de IL-4 modificado está bajo el control de elementos reguladores endógenos en 3'. En ciertos aspectos, la expresión de un gen de IL-4 modificado está bajo el control de elementos reguladores endógenos en 5' y 3'.

El gen de IL-4 modificado, humanizado, formado en un locus endógeno de IL-4, codifica una proteína IL-4 humana o humanizada. El término "humanizado" se refiere a ácidos nucleicos o proteínas que incluyen porciones o secuencias de un gen o una proteína que se encuentran en un animal no humano (por ejemplo, un roedor tal como ratón o rata), e incluyen, además, porciones o secuencias que difieren de las que se encuentran en un animal no humano, pero en su lugar corresponden (son idénticas) a porciones o secuencias de la contraparte del gen o la proteína humanos. El gen de IL-4 modificado, humanizado, puede codificar una proteína IL-4 que es al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica, o es 100 % idéntica, con una proteína IL-4 humana (por ejemplo, la proteína IL-4 humana codificada por el ácido nucleico que se expone en el núm. de registro del GenBank NM_000589.3).

Un roedor modificado genéticamente que tiene una sustitución de un gen endógeno de IL-4 de roedor en su totalidad o en parte, en un locus endógeno de IL-4, con un ácido nucleico de IL-4 humano, puede ser homocigoto o heterocigoto con respecto a la sustitución. En algunos aspectos, el roedor modificado genéticamente es heterocigoto con respecto a la sustitución, es decir, solo una de las dos copias del gen endógeno de IL-4 de roedor se ha sustituido con un ácido nucleico de IL-4 humano. En otros aspectos, el roedor modificado genéticamente es homocigoto con respecto a la sustitución, es decir, ambas copias del gen endógeno de IL-4 de roedor se han sustituido con un ácido nucleico de IL-4 humano.

El roedor modificado genéticamente expresa una proteína IL-4 humana o humanizada en el suero. En algunos aspectos, el roedor modificado genéticamente no expresa la proteína IL-4 endógena de roedor. En un aspecto, el suero del roedor que expresa una proteína IL-4 humana o humanizada tiene aproximadamente el mismo nivel de proteína IL-4 que un roedor que expresa una proteína IL-4 endógena funcional, por ejemplo, un roedor silvestre (por ejemplo, un roedor que expresa una proteína IL-4 endógena funcional, pero no comprende una sustitución de un gen endógeno de IL-4 en su totalidad o en parte, en un locus endógeno de IL-4, con un ácido nucleico de IL-4 humano). El término "aproximadamente el mismo nivel" significa un nivel que cae dentro del 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % o menos en cualquier dirección (es decir, mayor o menor) que el nivel en un roedor silvestre. En otros aspectos, el roedor expresa una proteína IL-4 humana o humanizada en el suero a una concentración de al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 % o 200 % del nivel de proteína IL-4 presente en el suero de un roedor de la misma edad que expresa una proteína IL-4 endógena funcional, pero no comprende una sustitución de un gen endógeno de IL-4 en su totalidad o en parte, en un locus endógeno de IL-4, con un ácido nucleico de IL-4 humano.

En algunos aspectos, un roedor modificado genéticamente que tiene una sustitución de un gen endógeno de IL-4 de roedor en su totalidad o en parte, con un ácido nucleico de IL-4 humano y que expresa una proteína IL-4 humana o humanizada en el suero tiene un sistema inmunológico normal, es decir, la cantidad de células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, en la sangre, el plasma o el suero del roedor que expresan la proteína IL-4 humana o humanizada es similar a la cantidad de células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, en la sangre, el plasma o el suero de un roedor que expresan una proteína IL-4 endógena funcional y no tiene una sustitución de un gen endógeno de IL-4 de roedor en su totalidad o en parte, con un ácido nucleico de IL-4 humano.

En aspectos adicionales, un roedor modificado genéticamente que tiene una sustitución de un gen endógeno de IL-4 de roedor en su totalidad o en parte, con un ácido nucleico de IL-4 humano y que expresa una proteína IL-4 humana o humanizada, incluye además una sustitución del gen endógeno de IL-4R α de roedor en su totalidad o en parte, en un locus endógeno de IL-4R α , con un ácido nucleico de IL-4R α humano, y como resultado, expresa además una IL-4R α humana o humanizada.

En otro aspecto, se describen en la presente roedores modificados genéticamente, por ejemplo, ratones o ratas, cuyo gen endógeno de IL-4R α de roedor se ha sustituido en su totalidad o en parte, en un locus endógeno de IL-4R α , con un ácido nucleico de IL-4R α humano.

La sustitución implica una sustitución de al menos un exón, es decir, uno o más exones, de un gen de IL-4R α de roedor con un ácido nucleico humano que comprende al menos un exón de un gen de IL-4R α humano. En algunos aspectos, la sustitución implica una sustitución de al menos uno de los exones de un gen de IL-4R α de roedor que codifica el ectodominio de roedor con al menos uno de los exones del gen de IL-4R α humano que codifica el ectodominio humano. En algunos aspectos, la sustitución implica una sustitución con un ácido nucleico humano que comprende al menos 2, 3 o 4 de los 5 exones que codifican el ectodominio de un gen de IL-4R α humano. En otras modalidades, un fragmento genómico contiguo de roedor que incluye el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 5 de un gen de IL-4R α de roedor se ha sustituido con un fragmento genómico que incluye el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 5 de un gen de IL-4R α humano. En una modalidad específica, el roedor es un ratón, y un fragmento genómico contiguo de ratón de aproximadamente 7,1 kb en un locus endógeno de IL-4R α de ratón, que incluye el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 5 y una porción del intrón 5, se elimina y se sustituye con aproximadamente 15,6 kb de una secuencia de ácido nucleico de IL-4R α humana que comprende el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 5 y una porción del intrón 5 del gen de IL-4R α humano.

En algunos aspectos, la sustitución da como resultado un gen de IL-4R α modificado, humanizado, en un locus endógeno del gen de IL-4R α , en donde la expresión del gen de IL-4R α modificado está bajo el control de elementos reguladores endógenos en el locus endógeno de IL-4R α .

El gen de IL-4R α modificado, humanizado, formado en un locus endógeno de IL-4R α , codifica una proteína IL-4R α humana o humanizada. En algunos aspectos, el gen de IL-4R α modificado, humanizado, codifica una proteína IL-4R α que es al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica, o es 100 % idéntica, con una proteína IL-4R α humana (por ejemplo, la proteína IL-4 humana codificada por el ácido nucleico que se expone en el núm. de registro del GenBank NM_000418.3). En otros aspectos, el gen de IL-4R α modificado codifica una proteína IL-4R α humanizada que comprende un ectodominio que es al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico, o es 100 % idéntico, con el ectodominio de una proteína IL-4R α humana (por ejemplo, la proteína IL-4 humana codificada por el ácido nucleico que se expone en el núm. de registro del GenBank NM_000418.3). En aspectos específicos, los dominios de transmembrana y citoplasmático de la proteína IL-4R α humanizada son idénticos con los dominios de transmembrana y citoplasmático de la proteína IL-4R α endógena de roedor.

Un roedor modificado genéticamente que tiene una sustitución de un gen endógeno de IL-4R α de roedor en su totalidad o en parte, en un locus endógeno de IL-4R α , con un ácido nucleico de IL-4R α humano, puede ser homocigoto o heterocigoto con respecto a la sustitución. En algunos aspectos, el roedor modificado genéticamente es heterocigoto con respecto a la sustitución, es decir, solo una de las dos copias del gen endógeno de IL-4R α de roedor se ha sustituido con un ácido nucleico de IL-4R α humano. En otros aspectos, un roedor modificado genéticamente es homocigoto con respecto a la sustitución, es decir, ambas copias del gen endógeno de IL-4R α de roedor se han sustituido con un ácido nucleico de IL-4R α humano.

El roedor modificado genéticamente descrito en la presente descripción expresa una proteína IL-4R α humana o humanizada en células inmunológicas, por ejemplo, células B y T. En algunos aspectos, el roedor modificado genéticamente no expresa la proteína IL-4R α endógena de roedor. En un aspecto, las células inmunológicas del roedor que expresa una proteína IL-4R α humana o humanizada, tienen aproximadamente el mismo nivel de proteína IL-4R α en las células inmunológicas que un roedor que expresa una proteína IL-4R α endógena, funcional, en las células inmunológicas de un roedor silvestre que expresa una proteína IL-4R α endógena funcional y no expresa la proteína IL-4R α humana o humanizada. En otros aspectos, el roedor expresa una proteína IL-4R α humana o humanizada en las células inmunológicas en una cantidad de al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 % o 200 % de la cantidad de proteína IL-4R α presente en las células inmunológicas de un roedor de la misma edad que expresa una proteína IL-4R α endógena funcional, pero no comprende una sustitución de un gen endógeno de IL-4R α en su totalidad o en parte, con un ácido nucleico de IL-4R α humano.

En algunos aspectos, un roedor modificado genéticamente que tiene una sustitución de un gen endógeno de IL-4R α de roedor en su totalidad o en parte con un ácido nucleico de IL-4R α humano y que expresa una proteína IL-4R α humana o humanizada tiene un sistema inmunológico normal, es decir, la cantidad de células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, en la sangre, el plasma o el suero del roedor que expresan la proteína IL-4R α humana o humanizada es similar a la cantidad de células inmunológicas, por ejemplo, células B y T, en la sangre, el plasma o el suero de un roedor silvestre (por ejemplo, un roedor que expresa una proteína IL-4R α endógena funcional y no tiene una sustitución de un gen endógeno de IL-4R α de roedor en su totalidad o en parte con un ácido nucleico de IL-4R α humano).

En algunos aspectos, un roedor modificado genéticamente que tiene una sustitución de un gen endógeno de IL-4R α de roedor en su totalidad o en parte, con un ácido nucleico de IL-4R α humano y que expresa una proteína IL-4R α humana o humanizada es capaz de mediar la señalización dependiente de IL-4 y la señalización dependiente de IL-13 y es funcional en esta mediación. Por ejemplo, una proteína IL-4R α humanizada que tiene el ectodominio de una proteína IL-4R α humana, expresada en las células inmunológicas de un roedor modificado genéticamente, interactúa

con la IL-4 humana y media la señalización dependiente de la IL-4 humana por medio de la formación de un receptor tipo I (ver la Figura 1). Tal proteína IL-4R α humanizada que tiene el ectodominio de una proteína IL-4R α humana interactúa además con la IL-13 humana y de ratón, y media la señalización dependiente de IL-13 por medio de la formación de un receptor tipo II (ver la Figura 1). La funcionalidad de una proteína IL-4R α humanizada expresada en un roedor modificado genéticamente puede evaluarse en diversos ensayos conocidos en la técnica, que incluyen los descritos específicamente en los ejemplos más adelante, tales como un ensayo que mide el cambio de clase a IgE inducido por IL-4 mediante el uso de células B primarias derivadas de un roedor modificado genéticamente.

En aspectos adicionales, un roedor modificado genéticamente que tiene una sustitución de un gen endógeno de IL-4R α de roedor en su totalidad o en parte, con un ácido nucleico de IL-4R α humano y que expresa una proteína IL-4R α humana o humanizada, incluye además una sustitución del gen endógeno de IL-4 de roedor en su totalidad o en parte, en un locus endógeno de IL-4, con un ácido nucleico de IL-4 humano, y como resultado, expresa además una IL-4 humana o humanizada.

En un aspecto adicional, se describen en la presente roedores doblemente humanizados, por ejemplo, ratones o ratas, cuyo gen endógeno de IL-4 de roedor se ha sustituido en su totalidad o en parte, en un locus endógeno de IL-4, con un ácido nucleico de IL-4 humano, y cuyo gen endógeno de IL-4R α de roedor se ha sustituido además en su totalidad o en parte, en un locus endógeno de IL-4R α , con un ácido nucleico de IL-4R α humano. Tales roedores doblemente humanizados pueden ser homocigotos o heterocigotos con respecto a cada sustitución de humanización. En un aspecto específico, el roedor doblemente humanizado es homocigoto con respecto a IL-4 humanizada e IL-4R α humanizada.

La modificación genética a un gen endógeno de IL-4 de roedor en un roedor doblemente humanizado incluye las modificaciones o sustituciones descritas anteriormente para un roedor modificado genéticamente que tiene una sustitución de un gen endógeno de IL-4 de roedor en su totalidad o en parte, con un ácido nucleico de IL-4 humano. De manera similar, la modificación genética a un gen endógeno de IL-4R α de roedor en un roedor doblemente humanizado incluye las modificaciones o sustituciones descritas anteriormente para un roedor modificado genéticamente que tiene una sustitución de un gen endógeno de IL-4R α de roedor en su totalidad o en parte con un ácido nucleico de IL-4R α humano. Por lo tanto, las características descritas anteriormente con respecto a la humanización del gen de IL-4 de roedor y con respecto a la humanización del gen de roedor, respectivamente, se incorporan en la presente descripción específicamente para un roedor doblemente humanizado.

En aspectos específicos, se describe en la presente un roedor doblemente humanizado, por ejemplo, un ratón o rata, que expresa una proteína IL-4 humana y una proteína IL-4R α humanizada, en donde la proteína IL-4R α humanizada incluye el ectodominio de una proteína IL-4R α humana e incluye los dominios de transmembrana y citoplasmático de la proteína IL-4R α endógena de roedor. En aspectos particulares, la expresión de la proteína IL-4 humana y la proteína IL-4R α humanizada está bajo el control de secuencias reguladoras endógenas de roedor en el locus endógeno de IL-4 de roedor y el locus de IL-4R α de roedor, respectivamente.

En algunos aspectos, un roedor doblemente humanizado tiene un sistema inmunológico normal (es decir, la cantidad de células inmunológicas es aproximadamente la misma que en un roedor silvestre), tiene aproximadamente el mismo nivel de proteína IL-4 en el suero, y expresa aproximadamente la misma cantidad de proteína IL-4R α en las células inmunológicas, que un roedor silvestre, donde un roedor silvestre es un roedor que expresa proteína IL-4 y proteína IL-4R α endógenas funcionales y no expresa proteína IL-4 o proteína IL-4R α humanas o humanizadas.

En aspectos particulares, un roedor doblemente humanizado muestra una vía de señalización de IL-4 funcional. El término "vía de señalización de IL-4 funcional" significa que tanto una proteína IL-4 humana o humanizada, como una proteína IL-4R α humana o humanizada, se expresan en un roedor doblemente humanizado e interactúan entre sí en el roedor doblemente humanizado para mediar de manera eficaz la transducción de señales corriente abajo y llevar a cabo las actividades biológicas de una vía de señalización de IL-4 normal. Las actividades biológicas de una vía de señalización de IL-4 normal se describen anteriormente y se ilustran en la Figura 1, que incluyen las mediadas a través de un receptor tipo I tales como el inicio y el mantenimiento de la diferenciación de Th2, activación y crecimiento de células B, cambio de clase a IgE e IgG4, y las mediadas a través de la señalización de un receptor tipo II tales como la hiperplasia de células caliciformes, la fibrosis subepitelial, y la remodelación tisular.

Por ejemplo, una vía de señalización de IL-4 funcional en un roedor doblemente humanizado se refleja por un fenotipo inflamatorio caracterizado, por ejemplo, por aumento de IgE en circulación, inflamación de las vías respiratorias y/o células infiltrantes eosinófilas en respuesta a un desafío con ácaros del polvo doméstico, cuyo fenotipo se observa además en roedores silvestres sin la humanización doble.

Métodos para obtener un animal no humano modificado genéticamente

Un animal no humano modificado genéticamente tal como un roedor puede obtenerse mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede obtenerse un vector de transformación que contiene un ácido nucleico humano (tal como un gen de IL-4 o IL-4R α humanos, en su totalidad o en parte), flanqueado por regiones corriente arriba y corriente abajo, homólogas a las del animal no humano. El constructo de transformación puede contener además un casete para la selección con fármacos (por ejemplo, un casete de selección con el gen *hygro* flanqueado

por sitios loxP, que posteriormente puede eliminarse mediante un vector de expresión transitoria de Cre), que se ubica 3' al ácido nucleico humano. El vector de transformación puede introducirse en el genoma de una célula de un animal no humano, por ejemplo, una célula madre embrionaria (ES) (tal como una célula ES de ratón) por electroporación, por ejemplo. Los clones de células ES transformadas correctamente pueden introducirse después en un embrión en etapa temprana (por ejemplo, un embrión de ratón en la etapa de 8 células). Los animales no humanos derivados completamente de células ES transformadas correctamente se identifican, por ejemplo, en base a un análisis de alelos. Para los animales no humanos donde las células ES genéticamente modificables adecuadas no están fácilmente disponibles, pueden emplearse otros métodos para obtener un animal no humano que comprenda las modificaciones genéticas como se describen en la presente descripción. 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.

Métodos para emplear un animal no humano modificado genéticamente

En un aspecto, los animales no humanos con IL-4 y/o IL-4R α modificadas genéticamente, que se describen en la presente descripción, se usan para evaluar la farmacodinámica (PD) y la eficacia terapéutica de antagonistas de IL-4 y/o IL-4R α específicos de humanos, por ejemplo, anticuerpos anti-IL-4 y/o anti-IL-4R α neutralizantes (por ejemplo, dupilumab) en diversos modelos de enfermedades, como se ilustra adicionalmente en los ejemplos más adelante.

En algunos aspectos, la presente invención proporciona un método de tamizaje para antagonistas de IL-4 o IL-4R α específicos de humanos mediante el uso de ratones doblemente humanizados para IL-4 e IL-4R α descritos en la presente descripción.

El término "antagonistas de IL-4 o IL-4R α " significa moléculas (por ejemplo, anticuerpos) que bloquean, suprimen o inhiben una o más funciones biológicas mediadas por IL-4 o IL-4R α . "Antagonistas de IL-4 o IL-4R α específicos de humanos" se refiere a antagonistas que son específicos para las IL-4 o IL-4R α humanas, y sustancialmente no actúan sobre la IL-4 o IL-4R α de roedor.

En aspectos específicos, el método de tamizaje utiliza un ratón doblemente humanizado que expresa una proteína IL-4 humana, y una proteína IL-4R α humanizada, en donde la proteína IL-4R α humanizada incluye el ectodominio de una proteína IL-4R α humana, unido a los dominios de transmembrana y citoplasmático de la proteína IL-4R α endógena de ratón, y en donde el ratón no expresa IL-4 de ratón o IL-4R α de ratón.

En algunos aspectos, el método de tamizaje para un antagonista de IL-4 o IL-4R α específico de humanos comprende administrar un agente a un roedor modificado genéticamente que está doblemente humanizado para IL-4 e IL-4R α como se describe en la presente descripción, determinar un efecto del agente sobre una función biológica mediada por la vía de señalización IL-4/IL-4R α , e identificar el agente como un antagonista de IL-4 o IL-4R α específico de humanos si antagoniza la función mediada por la vía de señalización IL-4/IL-4R α en el roedor modificado genéticamente.

En un aspecto, el agente comprende un dominio variable inmunoglobulínico que se une a IL-4 o IL-4R α . En un aspecto, el agente se une específicamente a IL-4 o IL-4R α humanas, pero no a IL-4 o IL-4R α de roedor. En un aspecto, el agente es un anticuerpo. En un aspecto específico, el agente es un anticuerpo que se une específicamente a la IL-4R α humana, pero no a la IL-4R α de roedor.

En un aspecto, el método de tamizaje utiliza un ratón doblemente humanizado que expresa una proteína IL-4 humana, y una proteína IL-4R α humanizada, en donde la proteína IL-4R α humanizada incluye el ectodominio de una proteína IL-4R α humana, unido a los dominios de transmembrana y citoplasmático de la proteína IL-4R α endógena de ratón, y en donde el ratón no expresa IL-4 murina o IL-4R α murino.

En algunos aspectos, el método de tamizaje incluye las etapas de inducir en un roedor doblemente humanizado como se describe en la presente descripción una enfermedad asociada con la señalización IL-4/IL-4R α , administrar un agente al roedor, determinar si el agente mejora la enfermedad, e identificar el agente como un antagonista de IL-4 o IL-4R α específico de humanos, adecuado para tratar la enfermedad si el agente mejora la enfermedad.

El término "enfermedad asociada con la señalización IL-4/IL-4R α " se refiere a una enfermedad en la cual está implicada la función biológica mediada por la señalización IL-4/IL-4R α . Los ejemplos de enfermedades asociadas con la señalización IL-4/IL-4R α incluyen, por ejemplo, enfermedades o trastornos inflamatorios, tales como asma, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) (que puede ser el resultado, al menos en parte, del humo del cigarrillo), enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, artritis, rinitis alérgica, esofagitis eosinofílica y psoriasis. El asma puede ser asma eosinofílica o no eosinofílica, y asma sensible a esteroides o resistente a esteroides.

En algunos aspectos, la enfermedad asociada con la señalización IL-4/IL-4R α es una inflamación de las vías respiratorias, que puede inducirse en un roedor mediante la administración intranasal de un alérgeno (por ejemplo, extracto de ácaros del polvo doméstico) en una o más dosis durante un período de tiempo. El efecto de un agente puede determinarse al medir si el grado de inflamación de las vías respiratorias (reflejado, por ejemplo, por acumulación de moco, células infiltrantes eosinófilas en un lavado broncoalveolar, niveles de IgE circulante total, y/o alteración en el perfil de expresión medible mediante un análisis de expresión por microarreglos) se reduce como resultado de la administración del agente. El alérgeno usado para inducir la inflamación de las vías respiratorias y el agente de prueba pueden administrarse simultáneamente o en momentos diferentes. En algunos aspectos, el alérgeno se administra al roedor en una o más dosis, y el agente de prueba se administra al roedor después que se ha administrado al menos una dosis del alérgeno al roedor.

En algunos aspectos, la enfermedad asociada con la señalización IL-4/IL-4R α es inflamación de la piel o dermatitis atópica, que pueden inducirse en un roedor al crear un daño en la piel y exponer la piel lesionada a un alérgeno (por ejemplo, una toxina bacteriana o un extracto de ácaros del polvo doméstico) en una o más dosis durante un período de tiempo. El efecto de un agente puede determinarse al medir si la inflamación de la piel se reduce como resultado de la administración del agente.

En un aspecto adicional, se usan animales no humanos triplemente humanizados, es decir, animales no humanos cuyos genes de IL-4, IL-4R α , e IL-33 se han humanizado, para evaluar la farmacodinámica (PD) y la eficacia terapéutica de compuestos candidatos tales como, por ejemplo, antagonistas de IL-4 y/o IL-4R α específicos de humanos, y antagonistas de IL-33 específicos de humanos.

El término "antagonistas de IL-33" significa moléculas (por ejemplo, anticuerpos) que bloquean, suprimen o inhiben una o más funciones biológicas o la señalización mediadas por IL-33. "Antagonistas de IL-33 específicos de humanos" se refiere a antagonistas que son específicos para la IL-33 humana, y sustancialmente no actúan sobre la IL-33 de roedor. Se conoce que la IL-33 estimula la transducción de señales a través de ST2 e IL-1 RAcP, que disminuye en la presencia de un antagonista, tal como un anticuerpo para IL-33. La inhibición de la transducción de señales de IL-33 a través de ST2 e IL-1 RAcP puede determinarse mediante un análisis para determinar la transducción de señales de IL-33 en un ensayo *in vitro* o *in vivo*, tal como los descritos en la solicitud publicada de los Estados Unidos núm. 2014/0271658 A1. Por ejemplo, un ensayo tal como el descrito en la solicitud publicada de los Estados Unidos núm. 2014/0271658 A1 puede usarse para evaluar el efecto de un anticuerpo para IL-33 en la inflamación pulmonar en animales sensibles a alérgenos que son homocigotos para la expresión de IL-33 humana. Un anticuerpo para IL-33 que es eficaz como un antagonista de IL-33 debe demostrar una tendencia hacia la reducción de las células inflamatorias en el pulmón, así como una tendencia hacia la reducción de las citocinas tales como IL-4 e IL-5.

En aspectos específicos, se usa un animal no humano triplemente humanizado en la presente descripción para evaluar compuestos candidatos, en donde el animal triplemente humanizado es un ratón triplemente humanizado que expresa una proteína IL-4 humana, una proteína IL-4R α humanizada que incluye el ectodominio de una proteína IL-4R α humana unido a los dominios de transmembrana y citoplasmático de una proteína IL-4R α de ratón, y una proteína IL-33 humana, en donde el ratón no expresa IL-4 de ratón, IL-4R α de ratón o IL-33 de ratón.

En algunos aspectos, un animal no humano triplemente humanizado se usa para evaluar la farmacodinámica (PD) y la eficacia terapéutica de un compuesto candidato, tal como, por ejemplo, un antagonista de IL-4 y/o IL-4R α específico de humanos, o un antagonista de IL-33 específico de humanos. Por ejemplo, un anticuerpo para IL-4 específico de humanos, un anticuerpo para IL-4R α específico de humanos, y un anticuerpo para IL-33 específico de humanos, pueden analizarse individualmente en un animal triplemente humanizado (tal como un roedor, por ejemplo, ratón o rata), y sus perfiles de PD y eficacias terapéuticas pueden evaluarse y compararse.

En otros aspectos, un animal no humano triplemente humanizado se usa para evaluar la eficacia de una combinación de compuestos, por ejemplo, una combinación de un anticuerpo antagonista de IL-4 y/o IL-4R α específico de humanos, con un anticuerpo antagonista de IL-33 específico de humanos, en comparación con la eficacia de los compuestos cuando se usan individualmente para determinar, por ejemplo, si la combinación de los compuestos muestra un efecto terapéutico sinérgico. En aspectos específicos, una combinación de un anticuerpo para IL-4 específico de humanos y un anticuerpo para IL-33 específico de humanos se analiza en un animal no humano triplemente humanizado. En otros aspectos específicos, una combinación de un anticuerpo para IL-4R α específico de humanos y un anticuerpo para IL-33 específico de humanos se analiza en un animal no humano triplemente humanizado.

Para evaluar un compuesto candidato o una combinación de compuestos, puede inducirse una enfermedad asociada con la señalización IL-4/IL-4R α y la señalización de IL-33 en el animal triplemente humanizado. Los ejemplos de enfermedades asociadas con la señalización IL-4/IL-4R α y la señalización de IL-33 incluyen, por ejemplo, enfermedades o trastornos inflamatorios, tales como asma, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) (que puede ser el resultado, al menos en parte, del humo del cigarrillo), enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, artritis, rinitis alérgica, esofagitis eosinofílica y psoriasis. El asma puede ser asma eosinofílica o no eosinofílica, y asma sensible a esteroides o resistente a esteroides. El efecto de un

compuesto o una combinación de compuestos puede evaluarse similarmente a un animal doblemente humanizado para IL-4/IL-4R α como se describió anteriormente.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

- 5
Ejemplo 1
- Sustitución del gen endógeno de IL-4 de ratón con un gen de IL-4 humano
- 10 El gen de IL-4 humano de 8,8 kb que contiene la porción codificante del exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 4 (que incluye la región 3' no traducida) y una porción de la región en 3' corriente abajo del exón 4 del gen de IL-4 humano sustituyó 6,3 kb del locus génico de IL-4 murino que abarca la porción codificante del exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 4 (que incluye la región 3' no traducida) y una porción de la región en 3' corriente abajo del exón 4. Ver la Figura 2A.
- 15 Se construyó un constructo de transformación para sustituir el gen de IL-4 de ratón con el humano en una sola etapa de transformación mediante el uso de la tecnología de ingeniería genética VelociGene® (ver Valenzuela y otros (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech, 21(6):652-659). Los ADN de IL-4 de ratón y humano se obtuvieron a partir de los clones de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) bMQ-41A12 y RP11-17K19, respectivamente. En resumen, un constructo de transformación linealizado con SbfI generado mediante clonación por reparación de brecha que contiene brazos de homología corriente arriba y corriente abajo de IL-4 de ratón que flanquean una secuencia de IL-4 humana de 8,8 kb que se extiende a partir del codón ATG en el exón 1 hasta el exón 4 (que incluye la región 3' no traducida) y una porción de la región en 3' corriente abajo del exón 4 (coordenadas genómicas: GRCh37: chr5:132,009,743-132,018,576 (cadena +)) y un casete de selección con el gen *hygro* flanqueado por sitios loxP, se sometió a electroporación en células madre embrionarias (ES) de ratón F1H4 (híbrido de C57BL/6 x 129 F1).
- 20 Las células ES transformadas correctamente (MAID 879) se sometieron a electroporación adicional con un vector de expresión transitoria de Cre para eliminar el casete de selección por fármacos. Los clones de células ES transformadas sin el casete para fármacos (MAID 1553) se introdujeron en un embrión de ratón SW en la etapa de 8 células mediante el método VelociMouse® (ver, las patentes de los Estados Unidos núm. 7,294,754, 7,576,259, 7,659,442, 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). Los VelociMice® (ratones F0 derivados completamente de la célula ES donante) que portan el gen de IL-4 humanizado se identificaron mediante el genotipado para determinar la pérdida del alelo de ratón y la ganancia del alelo humano mediante el uso de una modificación del ensayo de alelos (ver, Valenzuela y otros (2003))
- 30 Los clones de células ES transformadas correctamente se identificaron mediante un ensayo de pérdida de alelo nativo (LONA) (Valenzuela y otros 2003) en el cual el número de copias del gen de IL-4 nativo, no modificado se determinó mediante dos reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas (qPCR) TaqMan™ específicas para las secuencias en el gen de IL-4 de ratón que fueron objetivos de eliminación. Los ensayos de qPCR comprendieron los siguientes conjuntos de iniciadores-sondas (escritos de 5' a 3'): iniciador directo corriente arriba, CATGCACGGA GATGGATGTG (sec. con núm. de ident.:1); iniciador inverso corriente arriba, GACCCCTCAG GTCCACTTAC C (sec. con núm. de ident.:2); sonda corriente arriba, FAM-AACGTCCTCA CAGCAACGA-MGB (sec. con núm. de ident.:3); iniciador directo corriente abajo, GTGCCCAGGT GTGCTCATG (sec. con núm. de ident.:4); iniciador inverso corriente abajo, CGCCTGCCTC CTCACCTTAT C (sec. con núm. de ident.:5); sonda corriente abajo, FAM-ATCTGCTTCA CCATCCACT-MGB (sec. con núm. de ident.:6); en donde FAM se refiere a la sonda fluorescente 5-carboxifluoresceína y BHQ se refiere al desactivador de la fluorescencia del tipo de desactivador de hueco negro (Biosearch Technologies). El ADN purificado a partir de los clones de células ES que han incluido el vector de transformación y lo han incorporado en sus genomas se combinó con mezcla Maestra para la Expresión de Genes TaqMan™ (Life Technologies) de conformidad con las sugerencias del fabricante en una placa de PCR de 384 pocillos (MicroAmp™ Optical 384-Well Reaction Plate, Life Technologies) y se llevaron a cabo los ciclos en un equipo Prism 7900HT de Applied Biosystems, que recoge los datos de fluorescencia durante el transcurso de las PCR y determina un ciclo umbral (Ct), el ciclo de PCR fraccionario en el que la fluorescencia acumulada alcanza un umbral preestablecido. Las qPCR específicas de IL-4 corriente arriba y corriente abajo y las dos qPCR para los genes de referencia no objetivos se ejecutaron para cada muestra de ADN. Se calcularon las diferencias en los valores de Ct (Δ Ct) entre cada qPCR específica para IL-4 y cada qPCR para los genes de referencia, y después se calculó la diferencia entre cada Δ Ct y el Δ Ct promedio para todas las muestras analizadas para obtener los valores de $\Delta\Delta$ Ct para cada muestra. El número de copias del gen de IL-4 en cada muestra se calculó con la siguiente fórmula: número de copias = $2 \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Un clon transformado correctamente, que ha perdido una de sus copias nativas, tendrá un número de copias del gen de IL-4 igual a uno. La confirmación de que la secuencia génica de IL-4 humana sustituyó la secuencia génica eliminada de IL-4 de ratón en el alelo humanizado se obtuvo mediante un ensayo de qPCR TaqMan™ que comprende los siguientes conjuntos de iniciadores-sondas (escritos de 5' a 3'): iniciador directo humano, GCCTGGACCA AGACTCTGT (sec. con núm. de ident.:7); iniciador inverso humano, ACCGTGGGAC GGCTTCTTAC (sec. con núm. de ident.:8); sonda humana corriente arriba, FAM-CACCGAGTTG ACCGTAACAG ACATC-BHQ (sec. con núm. de ident.:9). La confirmación de que el casete de selección con *hygro*
- 40
45
50
55
60
65

se insertó con la secuencia génica de IL-4 humana en el alelo humanizado se obtuvo mediante un ensayo de qPCR TaqMan™ que comprende los siguientes conjuntos de iniciadores-sondas (escritos de 5' a 3'): iniciador directo de hygro, TGCGGCCGAT CTTAGCC (sec. con núm. de ident.:10); iniciador inverso de hygro, TTGACCGATT CCTTGCGG (sec. con núm. de ident.:11); sonda de hygro, FAM-ACGAGCGGGT TCGGCCATT C-BHQ (sec. con núm. de ident.:12).

El mismo ensayo LONA se usó para analizar el ADN purificado a partir de biopsias de la cola de ratones derivados de las células ES transformadas para determinar sus genotipos de IL-4 y confirmar que el alelo de IL-4 humanizado se había transmitido a través de la línea germinal. Dos crías heterocigotas para la sustitución se cruzan para generar un ratón que es homocigoto para la sustitución del gen endógeno de IL-4 de ratón por el gen de IL-4 humano. Las crías que son homocigotas para la sustitución se usan para el genotipado.

La unión corriente arriba del locus de IL-4 murino y la secuencia que contiene el gen de IL-4 humano se diseña para estar dentro de 5'-TGCTGATTGG CCCAGAATAA CTGACAATCT GGTGTAATAA AATTTTCCAA TGTAACCTCA TTTTCCCTTG GTTTCAGCAA CTTAACTCT ATATATAGAG AGACCTCTGC CAGCATTGCA TTGTTAGCAT CTCTTGATAA ACTTAATTGT CTCTCGTCAC TGACGGCACA GAGCTATTG(A TGGGTCTCAC CTCCCAACTG CTTCCCCCTC TGTTCTTCTT GCTAGCATGT GCCGGCAACT TTGTCCACGG ACACAAGTGC GATATCACCT TACAGGAGAT CATCAAACT TGAACAGCC TCACAGAGCA GAAG)GTGAGT ACCTATCTGG CACCATCTCT CCAGATGTTT TGGTGATGCT CTCAGTATT CTAGGCATGA AAACGTTAAC AGCTGCTAGA GAAGTTGGAA CTGGTGGTTG GTGGCAGTCC AGGGCACACA GCGAGGCTT TCCCCTGC (sec. con núm. de ident.:13), en donde las secuencias de IL-4 humanas están en letras cursivas y las secuencias codificantes de IL-4 están entre corchetes. La unión corriente abajo de la secuencia que contiene el gen de IL-4 humano y el casete de selección con el gen hygro flanqueado por sitios loxP, se diseña para estar dentro de 5'-TGTTTATTTT GCAG(AATTCC TGTCTGTGA AGGAAGCCAA CCAGAGTACG TTGGAAAAC TCTTGAAAAG GCTAAAGACG ATCATGAGAG AGAAATATTC AAAGTGTTTC AGCTGA)ATAT TTAATTTAT GAGTTTTTGA TAGCTTTTATT TTTTAAGTAT TTATATATTT ATAACATC ATAAAAATAA GTATATATAG AATCTAACAG CAATGGCATT TAATGTATTG GCTATGTTTA CTTGACAAAT GAAATTATGG TTTGCAACT TTAGGGAAT CAATTTAGTT TACCAAGAGA CTATAAATGC TATGGGAGCA AACAGGAAA GACCACTTCC CCCTCGAGGG GTTCCCTCTC GAGTTAGGGA CATAACACAC AAGATAATTA AAGAACACAA GGCCATACAA GATGCGGCCG CACCGGTATA ACTTCGTATA AGGTATCCTA TACGAAGTTA TATGCATGGC CTCCGCGCCG GGTTTTGGCG CCTCCCGCGG GCGCCCCCT CCTCACGGCG AGCGCTGCCA CGTCAGACGA AGGGCGCAGC GAGCGTCCTG ATCCT (sec. con núm. de ident.:14), en donde las secuencias de IL-4 humanas están en letras cursivas y las secuencias codificantes de IL-4 están entre corchetes. La unión corriente abajo de la secuencia del casete de selección con el gen hygro flanqueado por sitios loxP y el locus murino de IL-4, se diseña para estar dentro de 5'-TGCCAAGTTC TAATTCCATC AGACCTCGAC CTGCAGCCGG CGCGCCATAA CTTCGTATAA GGTATCCTAT ACGAAGTTAT CTCGAGAGGA GTTCCCACCC TTCTCAAGAG CATAATGCGC AGATCATTA GGGACAGATG CAGGCTGGG AGACGGTTCA GCAGTTAGGA GTACCTGTTG CTCTTCCAGA GGACCCAGGT TCAATTCCCG GCACTCACAT AGCAGCTTAA AACATAACT CAAGTTCTGG GGGAGCTGAT GCTCTCCTCT GGCCTCCTGT GGAGGTACAC AGACCACATG CCTGTAGGCA AGACACCCAC ACACATAAAA ACAAATAAAA ATAAGGATAG AAAGGCCAGG GGGATGAATC CAGAGGTAGA AGAAAACCTTA TTCCCTGGAA TTGTCTCTG ACTCCCCTCC CAAAACCTCT AACACGCAT (sec. con núm. de ident.:15), en donde las secuencias del casete con hygro están en letras cursivas.

Ejemplo 2

Sustitución de la secuencia génica endógena del ectodominio de IL-4Rα de ratón con una secuencia génica del ectodominio de IL-4Rα humano

El gen de IL-4Rα humano de 15,6 kb que contiene el exón 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 5 y una porción del intrón 5 del gen de IL-4Rα humano sustituyó 7,1 kb del locus génico de IL-4Rα murino que abarca el exón codificante 1 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 5 y una porción del intrón 5. Los exones de ratón del 6 al 9 se conservaron; solo los exones del 1 al 5 (es decir, el ectodominio) se humanizaron. Ver la Figura 2B.

Se construyó un constructo de transformación para sustituir el gen de IL-4Rα de ratón con el humano en una sola etapa de transformación mediante el uso de la tecnología de ingeniería genética VelociGene® (ver Valenzuela y otros (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech, 21(6):652-659). Los ADN de IL-4Rα de ratón y humano se obtuvieron a partir de los clones de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) RP23-136G14 y RP11-166E24, respectivamente. En resumen, un constructo de transformación linealizado con NotI generado mediante clonación por reparación de brecha que contiene brazos de homología corriente arriba y corriente abajo del gen de IL-4Rα que flanquean una secuencia de IL-4Rα humana de 15,6 kb que se extiende a partir del codón ATG en el exón 1 hasta el exón 5 y una porción del intrón 5 (coordenadas genómicas: GRCh37: chr16:27,351,525-27,367,111 (cadena +)) y un casete de selección con el gen neo flanqueado por sitios loxP, se sometió a electroporación en células madre embrionarias (ES) de ratón F1H4 (híbrido de C57BL/6 x 129 F1). Las células ES transformadas correctamente (MAID 803) se sometieron a electroporación adicional con un vector de expresión transitoria de Cre para eliminar el casete de selección por fármacos. Los clones de células ES transformadas sin el casete para fármacos (MAID 1444) se introdujeron en un

embrión de ratón SW en la etapa de 8 células mediante el método VelociMouse® (ver, las patentes de los Estados Unidos núm. 7,294,754, 7,576,259, 7,659,442, 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). Los VelociMice® (ratones F0 derivados completamente de la célula ES donante) que portan el gen de IL-4R α humanizado se identificaron mediante el genotipado para determinar la pérdida del alelo de ratón y la ganancia del alelo humano mediante el uso de una modificación del ensayo de alelos (ver, Valenzuela y otros (2003)).

Los clones de células ES transformadas correctamente se identificaron mediante un ensayo de pérdida de alelo nativo (LONA) (Valenzuela y otros 2003) en el cual número de copias del gen de IL-4R α nativo, no modificado se determinó mediante dos reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas (qPCR) TaqMan™ específicas para las secuencias en el gen de IL-4R α de ratón que fueron objetivos de eliminación. Los ensayos de qPCR comprendieron los siguientes conjuntos de iniciadores-sondas (escritos de 5' a 3'): iniciador directo corriente arriba, CCGCTGGCAT GTGTATTGTG (sec. con núm. de ident.:16); iniciador inverso corriente arriba, TGAGTGTGGG ACCCTCAAGA G (sec. con núm. de ident.:17); sonda corriente arriba, FAM-TGACCCAAGC CCTACATGGC CACT-BHQ (sec. con núm. de ident.:18); iniciador directo corriente abajo, TGAGGAGAGC TCACGGGAAT C (sec. con núm. de ident.:19); iniciador inverso corriente abajo, ACCCATCTCC TGCGTTTCTG (sec. con núm. de ident.:20); sonda corriente abajo, FAM-TTGACACGCC AGCTACACTG CTCCA-BHQ (sec. con núm. de ident.:21); en donde FAM se refiere a la sonda fluorescente 5-carboxifluoresceína y BHQ se refiere al desactivador de la fluorescencia del tipo de desactivador de hueco negro (Biosearch Technologies). El ADN purificado a partir de los clones de células ES que han incluido el vector de transformación y lo han incorporado en sus genomas se combinó con mezcla Maestra para la Expresión de Genes TaqMan™ (Life Technologies) de conformidad con las sugerencias del fabricante en una placa de PCR de 384 pocillos (MicroAmp™ Optical 384-Well Reaction Plate, Life Technologies) y se llevaron a cabo los ciclos en un equipo Prism 7900HT de Applied Biosystems, que recoge los datos de fluorescencia durante el transcurso de las PCR y determina un ciclo umbral (Ct), el ciclo de PCR fraccionario en el que la fluorescencia acumulada alcanza un umbral preestablecido. Las qPCR específicas de IL-4R α corriente arriba y corriente abajo y las dos qPCR para los genes de referencia no objetivos se ejecutaron para cada muestra de ADN. Se calcularon las diferencias en los valores de Ct (Δ Ct) entre cada qPCR específica para IL-4R α y cada qPCR para los genes de referencia, y después se calculó la diferencia entre cada Δ Ct y el Δ Ct promedio para todas las muestras analizadas para obtener los valores de $\Delta\Delta$ Ct para cada muestra. El número de copias del gen de IL-4R α en cada muestra se calculó con la siguiente fórmula: número de copias = $2 \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Un clon transformado correctamente, que ha perdido una de sus copias nativas, tendrá un número de copias del gen de IL-4R α igual a uno. La confirmación de que la secuencia génica de IL-4R α humana sustituyó la secuencia eliminada del gen de IL-4R α de ratón en el alelo humanizado se obtuvo mediante un ensayo de qPCR TaqMan™ que comprende los siguientes conjuntos de iniciadores-sondas (escritos de 5' a 3'): iniciador directo humano, ACCTGCGTCT CCGACTACAT G (sec. con núm. de ident.:22); iniciador inverso humano, GAGCTCGGTG CTGCAATTG (sec. con núm. de ident.:23); sonda humana, FAM-TGGGACCATT CATCTTCCAC TCGCA-BHQ (sec. con núm. de ident.:24). La confirmación de que el casete de selección con el gen neo se insertó con la secuencia génica de IL-4R α humana en el alelo humanizado se obtuvo mediante un ensayo de qPCR TaqMan™ que comprende los siguientes conjuntos de iniciadores-sondas (escritos de 5' a 3'): iniciador directo de neo, GGTGGAGAGG CTATTCCGGC (sec. con núm. de ident.:25); iniciador inverso de neo, GAACACGGCG GCATCAG (sec. con núm. de ident.:26); sonda de neo, FAM-TGGGCACAAC AGACAATCGG CTG-BHQ (sec. con núm. de ident.:27).

El mismo ensayo LONA se usó para analizar el ADN purificado a partir de biopsias de la cola de ratones derivados de las células ES transformadas para determinar sus genotipos de IL-4R α y confirmar que el alelo de IL-4R α humanizado se había transmitido a través de la línea germinal. Dos crías heterocigotas para la sustitución se cruzan para generar un ratón que es homocigoto para la sustitución del gen endógeno de IL-4R α de ratón por el gen de IL-4R α humano. Las crías que son homocigotas para la sustitución se usan para el genotipado.

La unión corriente arriba del locus de IL-4R α murino y la secuencia que contiene el gen de IL-4R α humano se diseñó para estar dentro de 5'-TGGGGGAGGG AGGCCATGAC ACAAATGAAA TGGACCCCGC TGACCCAGGA TCAGCATCTG CCCACTCTTC TTTCTGCAGG CACCTTTTGT GTCCCA(ATG GGGTGGCTTT GCTCTGGGCT CCTGTTCCCT GTGAGCTGCC TGGTCTGCT GCAGGTGGCA AGCTCTG)GTA AGTCACCACT TCTCAATCAT TCATTTGTTG GCTATTAATG GCGTGCCAGG GTCCTGCAGT ATGTCACTG GCC (sec. con núm. de ident.:28), en donde las secuencias de IL-4R α humanas están en letras cursivas y las secuencias codificantes de IL-4R α están subrayadas. La unión corriente abajo de la secuencia que contiene el gen de IL-4R α humano y el casete de selección con neo flanqueado por sitios loxP se diseñó para estar dentro de 5'-GTCAGATCGT GGAGGGTCTC GGACGAGGG TCCTGACCTT GGGTCTCCAG TCCTGGGAAG TGGAGCCCAG GCTGTACCAT GGCTGACCTC AGCTCATGGC Tcccgggctc gataactata acggctctaa ggtagcgact cgagataact tcgtataatg tatgctatac gaagtatat gcatggcctc cgcgccgggt ttggcgcct cccgcgggcg cccccctct cacggcgagc gctg (sec. con núm. de ident.:29), en donde las secuencias de IL-4R α humanas están en letras cursivas y las secuencias del casete están en minúsculas. La unión corriente abajo de la secuencia del casete de selección con el gen neo flanqueado por sitios loxP y el locus de IL-4R α murino se diseñó para estar dentro de 5'-tattgtttg ccaagttcta attccatcg acctcgact cgagccccta gataactcg tataatgat gctatacga gttatcctag gttggagctc TCTGTAGCCA GGTAACCAAG GGTCCCAGGG GAACCCCAG TGTGGACGCG GACTGCACAT GACACAGGGC GGCCTCCCCA TTCATGACTG TTTTCTCTCT TGCAG(ACTTC CAGCTGCCCC TGATACAGCG CCTTCCACTG GGGTCAACCA TCTCCTGCCT CTGCATCCCG TTGTTTTGCC

TGTTCTGTTA CTTTCAGCATT ACCAA)GTGAG TTCCTGCTTT GGCTGGTGTC TCTGGCTGGC CCTTCAGCAG TGCTCTCAGA GGTCACAGTC ATTGTGCTGG CTGAGAAAAG (sec. con núm. de ident.:30), en donde las secuencias codificantes de IL-4R α de ratón están entre corchetes, y las secuencias del casete con el gen neo están en minúsculas.

5

Ejemplo 3

Generación de ratones doblemente humanizados para IL-4/IL-4R α

10 Los ratones doblemente humanizados para IL-4/IL-4R α (Il4^{hu/hu}/Il4ra^{hu/hu}) se generaron de la siguiente manera. El clon de células ES MAID 803, que comprende el gen de IL-4R α humanizado y el casete con el gen neo flanqueado por sitios loxP, se sometió a electroporación con un vector de expresión de Cre para eliminar el casete con el gen neo flanqueado por sitios loxP para generar el clon de células ES MAID 1444, que comprende el gen de IL-4R α humanizado sin un casete de selección por fármacos (ver el Ejemplo 2). El mismo constructo de transformación que se usó para generar el clon de células ES MAID 879, que comprende el gen de IL-4 humanizado y el casete con el gen hygro flanqueado por sitios loxP (ver el Ejemplo 1), se sometió a electroporación en un clon de células ES MAID 1444 para generar las células ES 879 Het/1444 Het (Il4^{+hu}/Il4ra^{+hu}), que posteriormente se sometieron a electroporación con un vector de expresión de Cre para eliminar el casete con el gen hygro flanqueado por sitios loxP para generar un clon de células ES (MAID 1553/1444) que comprende genes de IL-4 e IL-4R humanizados. El clon de células ES MAID 1553/1444 sin el casete para fármacos se introdujo en un embrión de ratón SW en la etapa de 8 células para generar ratones doblemente humanizados para IL-4/IL-4R α .

Ejemplo 4

Evaluación de la eficacia de Dupilumab, un AcM para IL-4R α completamente humano, en ratones con sustituciones de los genes IL-4 e IL4R α humanos

Métodos

Se crearon ratones modificados genéticamente mediante el uso de la tecnología VelociGene® para sustituir el locus de IL-4 de ratón en su longitud completa con 8,8 kb de secuencias genómicas de IL-4 humanas (ver el Ejemplo 1 y la Figura 2A) y el dominio extracelular (es decir, el ectodominio) del gen de IL-4R α de ratón (CD124) con un fragmento de 15,6 kb del ADN genómico del IL-4R α humano correspondiente (ver el Ejemplo 2 y la Figura 2B).

Los ratones con un gen de IL-4R α humanizado homocigoto se validaron para la expresión y función del gen humano. Para determinar la expresión de IL-4R α humano por los ratones humanizados, se recolectaron esplenocitos de ratones silvestres y humanizados y se procesaron para un análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) con anticuerpos marcados con fluorescencia contra CD3 de ratón, CD19 de ratón, CD124 humano, y CD124 de ratón. (Ver, por ejemplo, Blaeser y otros (2003) Targeted inactivation of the IL-4 receptor a chain I4R motif promotes allergic airway inflammation, J Exp Med 198(8):1189-1200).

Para demostrar las especificidades de los ligandos y las funcionalidades de los receptores, se usaron células primarias derivadas de ratones con IL-4R α humanizada. Los macrófagos derivados de la médula ósea se cultivaron mediante el uso de células de la médula ósea femoral a partir de ratones silvestres y ratones con IL-4R α humanizada en DMEM que contiene 10 % de suero fetal bovino más 20 % de medio acondicionado de células T durante 7 días.

Las células se trataron después individualmente con 20 ng/ml de IL-4 de ratón, IL-13 de ratón, IL-4 humana, IL-13 humana, o vehículo diluido en medio de cultivo durante 20 horas. Se cosecharon muestras por cuadruplicado de cada condición para el análisis de expresión de genes.

El ARN total de estas muestras se extrajo y amplificó a ARNc mediante la incorporación de Cy3-CTP. El ARNc marcado con Cy3 de cada muestra se hibridó después a un arreglo de Agilent a la medida que comprende 43,538 oligos de 60 mer que cubren los transcriptomas de ratón. Los datos se extrajeron a partir de imágenes de los arreglos escaneados mediante el uso del programa informático Agilent Feature Extraction Software 9.5.

Los genes expresados diferencialmente entre los grupos experimentales se identificaron mediante el uso de la prueba t de Student ($p < 0,05$, cambio en veces $\geq 1,5$). Una agrupación de expresión de estos genes se generó mediante el uso del algoritmo de agrupación por la correlación de Pearson de GeneSpring GX7.3.

El efecto neutralizante de dupilumab contra IL-4 se evaluó mediante el uso de un ensayo de cambio de clase a IgE *in vitro* con células B primarias aisladas de ratones con IL-4R α humanizada (Il4ra^{hu/hu}).

65

Los ratones silvestres (WT) y con IL-4R α humanizada (*Il4ra*^{hu/hu}) recibieron un suministro génico conducido en un gran volumen (hidrodinámico) de una solución de ADN plasmídico desnudo para la expresión de IL-25 de ratón *in vivo*. (Ver, por ejemplo, Liu y otros (1999) Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA, Gene Therapy 6:1258-1266.) La sangre periférica se recolectó 8 días después para medir los niveles de IgE murina (mIgE) en suero mediante el uso de un estuche de ELISA comercial (R & D systems, MN).

Las células B primarias purificadas a partir de los esplenocitos de ratones humanizados se activaron con LPS bacteriano y se mezclaron con cantidades crecientes de IL-4 humana recombinante en un cultivo de 7 días para inducir el cambio de clases de inmunoglobulinas. Para el experimento de bloqueo con anticuerpos, las células B purificadas se incubaron con dosis crecientes de dupilumab durante 30 minutos antes de añadir IL-4 humana recombinante 0,167 nM y se cultivaron durante 7 días. La producción de IgE en ausencia de IL-4 o con el AcM de control de isotipo se muestra en (\diamond) y (Δ), respectivamente. Los niveles de IgE murina en los sobrenadantes de los cultivos se midieron mediante el uso de un estuche de ELISA comercial. (Ver, por ejemplo, Moon y otros (1989) Regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4 in mouse B cells, Scand J Immunol 30:355-361).

La interleucina-25 (IL-25) es una citocina producida por las células Th2 cuyas actividades principales están mediadas a través de la producción de IL-4 e IL-13 para inducir patologías específicas de tejidos, tales como el aumento de la producción de moco pulmonar y la hiperplasia de células caliciformes. (Ver, Fort y otros (2001) IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies *in vivo*, Immunity 15(6):985-995).

La ausencia de IL-13 protege a los animales de las patologías inducidas por IL-25 en un órgano objetivo. Por lo tanto, un modelo de inflamación pulmonar dirigido por la IL-25 se usó para evaluar las propiedades farmacodinámicas (PD) de dupilumab *in vivo* en ratones que comprenden genes de IL-4 y/o IL-4R α humanizados.

Las respuestas PD de dupilumab en los receptores tipo II se caracterizaron mediante el uso de un método de inflamación inducida por IL-25 al medir la acumulación de moco pulmonar en los ratones con IL-4R α *humanizada* (*Il4ra*^{hu/hu}).

En el día 0, los ratones WT y los ratones con IL-4R α humanizada (*Il4ra*^{hu/hu}) recibieron el suministro hidrodinámico del vector de expresión de IL-25 de ratón y le siguió una inyección de dupilumab o del AcM de control de isotipo en las dosis indicadas. Las dosis adicionales de anticuerpos se administraron en días alternos para un total de 4 dosis. En el día 8, se recolectaron tejidos pulmonares de los ratones sacrificados por eutanasia y las secciones pulmonares procesadas se tiñeron con ácido periódico-Schiff antes de evaluar a ciegas los cambios patológicos.

Resultados

Los ratones con IL-4R α humanizada se caracterizaron por mostrar: (a) expresión de IL-4R α humana en células primarias de los ratones doblemente humanizados para IL-4/IL-4R α (*Il4ra*^{hu/hu}/*Il4ra*^{hu/hu}) (ver la Figura 3); (b) cambio de las especificidades del ligando IL-4 en los ratones con IL-4R α humanizada (*Il4ra*^{hu/hu}) (ver la Figura 4); y (c) funcionalidad de la vía de IL-13 en los ratones con IL-4R α humanizada (*Il4ra*^{hu/hu}) (ver la Figura 4).

Como se muestra en la Figura 3, en donde se muestran los perfiles marcados de IL-4R α (CD124) en las poblaciones de células B y T clasificadas y la distribución de la población correspondiente de las células sin teñir se muestra en el área sombreada, los ratones silvestres y los ratones con IL-4R α humanizada (*Il4ra*^{hu/hu}) expresan cantidades similares de proteína IL-4R α en la superficie de las células B (CD19⁺, CD3⁻) y T (CD19⁻, CD3⁺).

Como se muestra en la Figura 4 (lado izquierdo), los ratones silvestres (*Il4ra*^{+/+}) responden a la IL-4 de ratón, pero no a la humana, y responden tanto a la IL-13 de ratón como a la humana. Como se muestra en la Figura 4 (lado derecho), los ratones con IL-4R α *humanizada* (*Il4ra*^{hu/hu}) responden a la IL-4 humana, pero no a la de ratón, y responden tanto a la IL-13 de ratón como a la humana.

Estos datos muestran que IL-4, pero no IL-13, muestra una especificidad de especie en ratones silvestres y ratones con IL-4R α humanizada (*Il4ra*^{hu/hu}).

Como se muestra en la Figura 5, el papel de la IL-4 como el factor principal que media el cambio de clase a IgE se apoyó en la ausencia de niveles elevados de IgE circulante después del suministro del gen de IL-25 de ratón en los ratones con IL-4R α humanizada (*Il4ra*^{hu/hu}).

El anticuerpo monoclonal dupilumab se investigó *in vitro* e *in vivo*.

Como se muestra en la Figura 6, dupilumab previene la producción de IgE inducida por la IL-4 humana en cultivos de células B primarias derivadas de ratones con IL-4R α humanizada (*Il4ra*^{hu/hu}).

Como se muestra en la Figura 7, dupilumab redujo las patologías pulmonares inducidas por IL-25 de manera dependiente de la dosis, a 10 mg/kg y superiores (25 mg/kg redujo la patología de moco)

Conclusiones

Los resultados demuestran la actividad farmacológica de dupilumab, un anticuerpo monoclonal completamente humano anti-IL-4R α humana, en un modelo de ratón modificado genéticamente con inflamación inducida por citocinas.

La generación de ratones modificados genéticamente con sustituciones de los genes de IL-4 y/o de IL-4R α humanos proporciona una herramienta poderosa para evaluar la función de genes ortólogos y la eficacia *in vivo* de anticuerpos candidatos con una limitada reactividad cruzada entre especies.

Ejemplo 5

Modelo de inflamación pulmonar inducida por un extracto de ácaros del polvo doméstico (HDM)

La inflamación crónica de las vías respiratorias en ratones doblemente humanizados para IL-4 e IL-4R α se induce mediante un desafío intranasal con un extracto de ácaros del polvo doméstico (HDM) (Greer laboratories). En resumen, los ratones se sensibilizaron primero mediante una instilación intranasal de una suspensión de HDM (20 μ l a la concentración de 2,5 μ g/ml) durante 10 días. Después de un intervalo de dos semanas de resolución, los ratones se volvieron a estimular con una aplicación intranasal de HDM 3 veces por semana entre la semana 5 y 12. El tratamiento de dupilumab (anticuerpo anti-IL4R α) se inició a partir de la 7ma semana con la frecuencia de dos veces semanales mediante inyecciones subcutáneas hasta el final del experimento en la semana 12. Las muestras de tejidos se recolectaron para análisis posteriores. El diseño experimental se representa en la Figura 8.

Demostración de la eficacia terapéutica de dupilumab en el modelo de inflamación de las vías respiratorias inducida por HDM mediante el uso de ratones doblemente humanizados para IL-4 e IL-4R α

La enfermedad de las vías respiratorias se indujo en ratones doblemente humanizados para IL-4 e IL-4R α (IL-4^{hu/hu}/IL-4R^{hu/hu}) mediante el uso del protocolo descrito anteriormente. El análisis histológico del tejido pulmonar mostró que la instilación intranasal de HDM provocó un aumento de la producción de moco en las vías respiratorias. El tratamiento de dupilumab redujo la acumulación de moco en los ratones sometidos a desafío con HDM. El análisis de las células infiltrantes en un lavado broncoalveolar (BALF) indica que los conteos de eosinófilos se incrementaron por la instilación de HDM y se redujeron por el tratamiento de dupilumab. La IgE circulante total se elevó por el tratamiento de HDM en los ratones humanizados, lo que sugiere una vía de señalización de IL-4 competente. El uso de dupilumab fue capaz de reducir el nivel de IgE. Por el contrario, una molécula de comparación, IL13R2 α -Fc, que antagoniza IL-13 solamente sin interferir con la transducción de señales de IL-4, tuvo actividades comparables en la reducción de la acumulación de moco y la prevención de la infiltración de eosinófilos. Sin embargo, se detectó un efecto diferencial en el nivel de IgE circulante entre dupilumab y el antagonista de IL-13, IL13R2 α -Fc. El bloqueo de la vía de IL-13 solamente no fue suficiente para reducir el nivel de IgE inducido por HDM; mientras que el dupilumab redujo la producción de IgE, un mediador patogénico principal de la alergia, mediante el bloqueo de las vías de IL-4 e IL-13.

En un conjunto separado de experimentos, la enfermedad de las vías respiratorias se indujo en ratones doblemente humanizados para IL-4 e IL-4R α (IL-4^{hu/hu}/IL-4R^{hu/hu}) mediante el uso del mismo protocolo descrito anteriormente, excepto que se usó un control diferente. En estos experimentos se usó un anticuerpo de control de isotipo del mismo isotipo IgG que dupilumab. El diseño experimental se representa en la Figura 9. El ARNm se purificó a partir del ARN total mediante el uso del estuche para ARNm Dynabeads (Life Tech) y la biblioteca de RNA-Seq específica de cadenas se preparó a partir del ARNm mediante el uso del estuche Scriptseq ARN Library Prep (Illumina). La biblioteca se secuenció mediante el uso de HiSeq 2000 (Illumina) a una longitud de lectura de 33 pb y los niveles de expresión génica se extrajeron a partir de las lecturas en bruto mediante el uso del flujo de trabajo de RNA-Seq de ClcBio (Qiagen). Los genes expresados diferencialmente entre los grupos experimentales se identificaron mediante el uso de la prueba t de Student ($p < 0,05$, cambio en veces $\geq 1,5$). Una agrupación de expresión de estos genes se generó mediante el uso del algoritmo de agrupación por la correlación de Pearson de GeneSpring GX7.3. Se encontró que HDM induce una alteración de la expresión génica pulmonar en los ratones doblemente humanizados para IL-4 e IL-4R α y tal alteración se bloqueó por dupilumab. Las muestras de suero se recolectaron de los ratones sacrificados por eutanasia al final del período de tratamiento. Los niveles de IgE murina en suero se midieron mediante el uso de un estuche de ELISA comercial (R & D systems). El análisis estadístico se realizó mediante el uso del método habitual del ANOVA de una vía.

Ejemplo 6

Modelo de inflamación cutánea inducida por antígenos

La inflamación crónica de la piel en ratones doblemente humanizados para IL-4 e IL-4R α puede inducirse mediante el siguiente procedimiento. El pelo del lomo de los ratones humanizados se afeita con una maquinilla eléctrica y después se tira de la piel con cinta adhesiva para crear lesiones menores y romper la barrera cutánea. Un parche de gasa empapado con una solución de alérgeno (tal como ovoalbúmina más toxina bacteriana o extracto de ácaros del

polvo doméstico) se une a la piel durante una semana seguido de dos semanas como período de resolución. El procedimiento se repite tres veces durante un total de 7 semanas para inducir lesiones de la piel similares a una dermatitis atópica. Los ratones tratados habrán aumentado los niveles de IgE, prurito, engrosamiento de la epidermis, síntomas típicos de la dermatitis atópica.

5 Ejemplo 7

Caracterización de los perfiles de PK de anticuerpos anti-IL-4R α humana en ratones que expresan IL-4R α humanizada

10 Este ejemplo describe experimentos realizados para evaluar los perfiles de PK de REGN 668 (anticuerpo monoclonal humano dirigido a IL-4R α humana, conocido además como "dupilumab") y el anticuerpo de control REGN646 (anticuerpo de control de no unión a anti-mfIL-4R, sustituto de monos).

15 Los ratones usados en estos experimentos fueron ratones MAID 1444 (homocigotos para IL-4R α humanizada o "IL-4R α HumIn", en donde el ectodominio de IL-4R α es humano y las regiones de transmembrana y citoplasmática son de ratón) y ratones silvestres ("WT") de cepa similar (75 % C57BL/6 / 25 % 129Sv) de 20-23 semanas. El grupo de estudio incluyó un total de 40 ratones, machos y hembras, con un tamaño de la cohorte por fármaco/por dosis de 5 homocigotos y 5 WT de la misma cepa. Los anticuerpos (en tampón PBS) se administraron a los ratones mediante inyección subcutánea a 10 mg/kg. Las muestras de sangre se tomaron para su análisis en el día de la inyección (punto de tiempo "0" o día 0), a las 6 hr después de la inyección, y en el día 1, día 3, día 7, día 10, día 14, día 21, y día 30, respectivamente.

25 Los niveles del fármaco circulante (es decir, REGN668 o REGN646) se determinaron mediante el análisis de anticuerpos humanos totales mediante el uso de un inmunoensayo ELISA. En resumen, las placas de 96 pocillos se recubrieron con un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch, #109-005-098) para capturar los anticuerpos humanos analizados en los sueros, y después los anticuerpos unidos a la placa se detectaron mediante el uso de un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch, #109-035-098) y el sustrato TMB (BD Pharmingen). Las muestras de suero se prepararon en diluciones en serie de seis dosis por muestra que varían de 1:100-1:243,000 y los estándares de referencia de los anticuerpos respectivos se prepararon en diluciones en serie de 12 dosis. Las concentraciones de los anticuerpos como fármacos en los sueros se calcularon en base a la curva patrón de referencia generada mediante el uso del programa informático Graphpad Prism.

35 Se encontró que la vida media de REGN 668 es más corta en los ratones con IL-4R α HumIn en comparación con los ratones silvestres con la proteína IL-4R α de ratón solamente. Esta diferencia en los perfiles de PK podría explicarse por la interacción mediada por el objetivo y el aclaramiento entre los anticuerpos monoclonales y el receptor de IL-4 α humano. Por lo tanto, los ratones que expresan IL-4R α humana o humanizada proporcionan una simulación adecuada para caracterizar las propiedades PK de los anticuerpos anti-IL-4R α humana (por ejemplo, dupilumab) en un modelo preclínico de ratón.

Usos de los ratones con IL-4 y/o IL-4R α humanizadas

45 IL-4 y/o IL-4R α humanizadas son útiles para evaluar la farmacodinámica (PD) de antagonistas de IL-4 y/o IL-4R α específicos de humanos, por ejemplo, anticuerpos neutralizantes anti-IL-4 y/o anti-IL-4R α , por ejemplo, dupilumab.

Los ensayos de farmacocinética (PK) y PD en ratones con IL-4 y/o IL-4R α humanizadas se realizan de conformidad con procedimientos estándar conocidos en la técnica.

50 Los ratones con IL-4 y/o IL-4R α humanizadas son útiles para probar la eficacia terapéutica *in vivo* de antagonistas de IL-4 y/o IL-4R α específicos de humanos, por ejemplo, anticuerpos neutralizantes anti-IL-4 y/o IL-4R α , por ejemplo, dupilumab, en una variedad de modelos de enfermedades conocidos en la técnica, por ejemplo, como se mostró anteriormente.

55 Ejemplo 8

Sustitución del gen endógeno de IL-33 de ratón con un gen de IL-33 humano

60 El gen de IL-33 de ratón (Ident. del gen en NCBI: 77125, Fuente primaria: MGI:1924375; RefSeq del transcrito: NM_001164724.1; Ident. de UniProt: Q8BVZ5; Ensamblaje genómico: NCB137/mm9; Ubicación: chr19:29,999,604-30,035,205 cadena +) tiene 8 exones y codifica una proteína de 266 aminoácidos (núm. de registro del GenBank NP_001158196.1).

65 El gen de IL-33 humano (Ident. del gen en NCBI: 90865, Fuente primaria: HGNC:16028; RefSeq del transcrito: NM_033439.3; Ident. de UniProt: 095760; Ensamblaje genómico: GRCh37/hg19; Ubicación: chr9:6,215,149-

6,257,983 cadena +) también tiene 8 exones y codifica una proteína de 270 aminoácidos (núm. de registro del GenBank NP_254274.1).

5 Un segmento genómico humano de 16 333 pb que contiene el exón 2 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta el exón 8 (que incluye la región 3' no traducida) del gen de IL-33 humano sustituyó 9381 pb del locus génico de IL-33 de ratón que abarca el exón 2 que comienza a partir del codón de iniciación ATG hasta la porción codificante del exón 8 que incluye el codón de parada. Ver la Figura 10A.

10 Se construyó un constructo de transformación para sustituir el gen de IL-33 de ratón con un segmento genómico de IL-33 humano en una sola etapa de transformación mediante el uso de la tecnología de ingeniería genética VelociGene® (ver Valenzuela y otros (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech, 21(6):652-659), similar al procedimiento descrito en el Ejemplo 1 anterior para sustituir el gen de IL-4 de ratón con un segmento genómico de IL-4 humano, excepto que el ADN de IL-33 de ratón y humano se obtuvieron de los clones de cromosoma artificial bacteriano (BAC) bMQ-350118 y CTD-3015M15, respectivamente, y que el vector de transformación contenía un casete de selección con el gen de neomicina flanqueado por sitios loxP (Figura 10B).

20 Los clones de células ES transformadas correctamente (MAID 7060) se identificaron mediante un ensayo de pérdida de alelo nativo (LONA) (Valenzuela y otros 2003) en el cual el número de copias del gen de IL-33 nativo, no modificado se determinó mediante dos reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas (qPCR) TaqMan™ específicas para las secuencias en el gen de IL-33 de ratón que fueron objetivos de eliminación. Los ensayos de qPCR comprendieron los siguientes conjuntos de iniciadores-sondas (escritos de 5' a 3'):

corriente arriba ("mTU"):
 25 iniciador directo, TTGGACTAGTAACAAGAAGGGTAGCA (sec. con núm. de ident.: 31);
 iniciador inverso, CCTTTCCCATCACCTCTAACTT (sec. con núm. de ident.: 32);
 sonda (MGB), AGCTCTGGTGGACAGA (sec. con núm. de ident.: 33);
 corriente abajo ("mTD"):
 30 iniciador directo, TCTCTGCCAAGCTGCTTATCC (sec. con núm. de ident.: 34);
 iniciador inverso, GGCTGCATGGAAGAGGTGAA (sec. con núm. de ident.: 35);
 sonda (MGB), CTCTCCACAAATCG (sec. con núm. de ident.: 36);

35 La confirmación de que la secuencia génica de IL-33 humana sustituyó a la secuencia génica de IL-33 de ratón en el alelo humanizado se obtuvo mediante un ensayo de qPCR TaqMan™ que comprende los siguientes conjuntos de iniciadores-sondas (escritos de 5' a 3'):

corriente arriba ("hTU")
 40 iniciador directo, CAGGCAGGAATAGCTGAGATAATCT (sec. con núm. de ident.: 37);
 iniciador inverso, TGTGGAGCAAAAAGTGGTTGAT (sec. con núm. de ident.: 38);
 sonda (MGB), CCTGTGAATAGTGATAAAC (sec. con núm. de ident.: 39);
 corriente abajo ("hTD"):
 45 iniciador directo, CAGTTCCAAACGATAGGCTCAA (sec. con núm. de ident.: 40);
 iniciador inverso, ATAATTCTGTGAAGCATCTGGTCTTC (sec. con núm. de ident.: 41);
 sonda (MGB), CTAGAGCTGCTAGTAAAA (sec. con núm. de ident.: 42);

45 La unión corriente arriba del locus de IL-33 murino y la secuencia que contiene el gen de IL-33 humano (mostrada como "I" en la Figura 10B) se diseña para estar dentro de 5'- ATAGCCAAGG TTGCTTCTGA TGACTTCAGG TCCATATAGT TGGATTAATG TTATATTTCA ATCCACAGA AACCTGAAAA ATGAAGCCTA AAATGAAGTA TCAACCAAC AAAATTTCCA CAGCAAAGTG GAAGAACA GCAAGCAAAG CCTGTGTTT-3' (sec. con núm. de ident.: 43), en donde la secuencia de IL-33 humana está en letras cursivas y el codón de inicio ATG humano está subrayado. La unión corriente abajo de la secuencia que contiene la secuencia genómica de IL-33 humana y el casete de selección con el gen de neomicina flanqueado por sitios loxP (mostrada como "II" en la Figura 10B) se diseña para estar dentro de 5'- TTTATATTAT TGAATAAAGTATATTTTCCA AATGTATGTGAGACTATAAT GATTTTATCA TATGATGACT CAATATTCTG/CTCGAGATAA CTTCGTATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT ATGCATGGCC TCCGCGCCGG GTTTTGCGC CTCCCGCGGG -3' (sec. con núm. de ident.: 44), en donde la secuencia de IL-33 humana está en letras cursivas y la unión se indica mediante el símbolo "/", y el sitio lox P está subrayado. La unión corriente abajo de la secuencia del casete de selección con el gen neo flanqueado por sitios loxP y el locus de IL-33 murino (mostrada como "III" en la Figura 10C) se diseña para estar dentro de 5'- AGCCCTAGA TAACTTCGTA TAATGTATGC TATACGAAGT TATGCTAGTA ACTATAACGG TCCTAAGGTA GCGAGCTAGC/CGCCTGTGCG TTCTGGGTTG AATGACTTAA TGCTTCCAAC TGAAGAAAGG GTAACAGAGA GAAAGAAAGC CATTCTTGGC-3' (sec. con núm. de ident.: 45), en donde la unión se muestra mediante el símbolo "/", y el sitio loxP está subrayado.

65 Las células ES transformadas correctamente (MAID 7060) se sometieron a electroporación adicional con un vector para la expresión transitoria de Cre para eliminar el casete de selección por fármacos y obtener clones de células ES sin el casete para fármacos (MAID 7061). La unión corriente arriba en estas células ES MAID 7061 (mostrada como "I" en la Figura 18C) es la misma que en las células ES MAID 7060. La unión corriente abajo (mostrada como "II" en

la Figura 18C) se diseña para estar dentro de 5'-TTTATATTAT TGAATAAAGT ATATTTTCCA AATGTATGTG
 AGACTATAAT GATTTTATCA TATGATGACT CAATATTCTG/CTCGAGATAA CTTCGTATAA TGTATGCTAT
 ACGAAGTTAT GCTAGTAACT ATAACGGTCC TAAGGTAGCG AGCTAGC/CGCCTGTGCG TTCTGGGTTG
 AATGACTTAA TGCTTCCAAC TGAAGAAAGG GTAACAGAGA GAAAGAAAGC CATTCTTGGC-3' (sec. con núm.
 5 de ident.: 46), en donde la secuencia de IL-33 humana en 3' está en letras cursivas antes del primer símbolo "/", y la
 secuencia de IL-33 de ratón en 3' está en letras cursivas después del segundo símbolo "/", y el sitio loxP está
 subrayado.

Las células ES transformadas correctamente (MAID 7060 o MAID 7061) se introdujeron en un embrión de ratón SW
 10 en la etapa de 8 células mediante el método VelociMouse® (ver, las patentes de los Estados Unidos núm.
 7,294,754, 7,576,259, 7,659,442, y Poueymiro 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). Los
 VelociMice® (ratones F0 derivados completamente de la célula ES donante) que portan el gen de IL-33 humanizado
 15 se identificaron mediante el genotipado para determinar la pérdida del alelo de ratón y la ganancia del alelo humano
 mediante el uso de una modificación del ensayo de alelos (ver, Valenzuela y otros (2003)) El mismo ensayo LONA
 se usó para analizar el ADN purificado a partir de biopsias de la cola de ratones derivados de las células ES
 transformadas para determinar sus genotipos de IL-33 y confirmar que el alelo de IL-33 humanizado se había
 20 transmitido a través de la línea germinal. Dos crías heterocigotas para la sustitución se cruzaron para generar un
 ratón que es homocigoto para la sustitución del gen endógeno de IL-33 de ratón por el gen de IL-33 humano.

Listado de secuencias

<110> Wang, Li-Hsien
 Xue, Yingzi
 25 Murphy, Andrew J.
 Stevens, Sean

<120> ANIMALES CON IL-4 e IL-4Ra HUMANIZADAS

30 <130> 31260 (T0029)

<150> 61/989,757
 <151> 2014-05-07

35 <160> 46

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 1
 50 catgcacggagatggatgtg 20

<210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 2
 60 gaccctcaggtccacttac c 21

<210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 656 529 T3

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

5 <220>
<221>misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223>Marcado con FAM: sonda fluorescente 5-carboxifluoresceína

10 <220>
<221>misc_feature
<222> (25) .. (25)
<223>Marcado con BHQ: desactivador de la fluorescencia del tipo de desactivador de hueco negro

15 <400> 3
aacgtcctcacagcaacga 19

20 <210> 4
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 4
gtgccagggtgctcatg 19

30 <210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 5
cgctgcctcctcactttat c 21

40 <210> 6
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

50 <220>
<221>misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223>Marcado con FAM: sonda fluorescente 5-carboxifluoresceína

55 <220>
<221>misc_feature
<222> (19) .. (19)
<223>Marcado con BHQ: desactivador de la fluorescencia del tipo de desactivador de hueco negro

60 <400> 6
atctgcttcaccatccact 19

60 <210> 7
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 7
 gcctggaccaagactctgt 19

5 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 8
 accgtgggacggcttcttac 20

15 <210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 25 <221>misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223>Marcado con FAM: sonda fluorescente 5-carboxifluoresceína

<220>
 30 <221>misc_feature
 <222> (19) .. (19)
 <223>Marcado con BHQ: desactivador de la fluorescencia del tipo de desactivador de hueco negro

<400> 9
 35 caccgagttgaccgtaacagacatc 25

<210> 10
 <211> 17
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 10
 45 tgcggccgatcttagcc 17

<210> 11
 <211> 18
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 11
 55 ttgaccgattccttgcg 18

<210> 12
 60 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 65 <223> Oligonucleótido sintético

ES 2 656 529 T3

<220>
<221>misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223>Marcado con FAM: sonda fluorescente 5-carboxifluoresceína
5

<220>
<221>misc_feature
<222> (21) .. (21)
<223>Marcado con BHQ: desactivador de la fluorescencia del tipo de desactivador de hueco negro
10

<400> 12
acgagcgggttcgcccatt c 21

<210> 13
15 <211> 458
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Secuencia de ácido nucleico que contiene la unión corriente arriba del locus de IL4 murino y la secuencia de
IL4 humana

<400> 13

ES 2 656 529 T3

5 tgctgattgg cccagaataa ctgacaatct ggtgtaataa aattttccaa tgtaaactca 60
 ttttcccttg gtttcagcaa ctttaactct atatatagag agacctctgc cagcattgca 120
 ttgttagcat ctcttgataa acttaattgt ctctcgtcac tgacggcaca gagctattga 180
 tgggtctcac ctcccaactg cttccccctc tgttcttctt gctagcatgt gccggcaact 240
 10 ttgtccacgg acacaagtgc gatatcacct tacaggagat catcaaaact ttgaacagcc 300
 tcacagagca gaaggtgagt acctatctgg caccatctct ccagatgttc tggatgatgct 360
 ctcagtattt ctaggcatga aaacgttaac agctgctaga gaagttggaa ctggtggttg 420
 15 gtggcagtcg agggcacaca gcgaggcttc tcccctgc 458

20 <210> 14
 <211> 565
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico que contiene la unión corriente abajo de la secuencia de IL4 humana y el casete de selección con el gen hygro flanqueado por sitios loxP

30 <400> 14
 tgtttatttt gcagaattcc tgtcctgtga aggaagccaa ccagagtacg ttggaaaact 60
 tcttgaaag gctaaagacg atcatgagag agaaatattc aaagtgttcg agctgaatat 120
 tttaatttat gagtttttga tagctttatt ttttaagtat ttatatattt ataactcatc 180
 35 ataaaataaa gtatatatag aatctaacag caatggcatt taatgtattg gctatgttta 240
 cttgacaaat gaaattatgg tttgcaactt ttagggaaat caatttagtt taccaagaga 300
 ctataaatgc tatgggagca aaacaggaaa gaccacttcc ccctcgaggg gttccctctc 360
 40 gagttagga cataacacac aagataatta aagaacacaa ggccatacaa gatgcggccg 420
 caccggtata acttcgtata aggtatccta tacgaagtta tatgcatggc ctccgcgccg 480
 45 ggttttgggc cctcccggcg gcgccccct cctcacggcg agcgtgccca cgtcagacga 540

50 <210> 15
 <211> 438
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico que contiene la unión corriente abajo del casete de selección con el gen hygro flanqueado por sitios loxP y el locus de IL-4 murino

ES 2 656 529 T3

<400> 15

	tgccaagttc taattccatc agacctcgac ctgcagccgg cgcgccataa ctctgtataa	60
5	ggtatcctat acgaagttat ctcgagagga gttcccaccc ttctcaagag cataatgcgc	120
	agatcattaa gggacagatg caggctgggg agacggttca gcagttagga gtacctgttg	180
10	ctcttccaga ggacccaggt tcaattcccg gcactcacat agcagcttaa aacaataact	240
	caagttctgg gggagctgat gctctcctct ggcctcctgt ggaggtagac agaccacatg	300
	cctgtaggca agacacccac acacataaaa acaaaataaa ataaggatag aaaggccagg	360
15	gggatgaatc cagaggtaga agaaaactta ttccctggaa ttgtcctctg actcccctcc	420
	caaacctct aacacgca	438

20 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 16
 ccgctggcatgtgtatttg 20

30 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 17
 tgagtgtgggaccctcaaga g 21

40 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <220>
 <221>misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223>Marcado con FAM: sonda fluorescente 5-carboxifluoresceína

55 <220>
 <221>misc_feature
 <222> (24) .. (24)
 <223>Marcado con BHQ: desactivador de la fluorescencia del tipo de desactivador de hueco negro

60 <400> 18
 tgaccaagccctacatggccact 24

65 <210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 19
 tgaggagagctcacggaat c 21

<210> 20
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 20
 acccatctctgctgcttctg 20

<210> 21
 <211> 25
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221>misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 30 <223>Marcado con FAM: sonda fluorescente 5-carboxifluoresceína

<220>
 <221>misc_feature
 <222> (25) .. (25)
 35 <223>Marcado con BHQ: desactivador de la fluorescencia del tipo de desactivador de hueco negro

<400> 21
 ttgacacgccagctacactgctcca 25

40 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 22
 50 acctgctctccgactacat g 21

<210> 23
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 23
 60 gagctcggctgctgaattg 19

<210> 24
 <211> 25
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

- <220>
<223> Oligonucleótido sintético
- 5 <220>
<221>misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223>Marcado con FAM: sonda fluorescente 5-carboxifluoresceína
- 10 <220>
<221>misc_feature
<222> (25) .. (25)
<223>Marcado con BHQ: desactivador de la fluorescencia del tipo de desactivador de hueco negro
- 15 <400> 24
tgggaccattcatcttccactcgca 25
- 20 <210> 25
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> Oligonucleótido sintético
- 25 <400> 25
ggtggagaggctattcggc 19
- 30 <210> 26
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> Oligonucleótido sintético
- 35 <400> 26
gaacacggcggcatcag 17
- 40 <210> 27
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>
<223> Oligonucleótido sintético
- 50 <220>
<221>misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223>Marcado con FAM: sonda fluorescente 5-carboxifluoresceína
- 55 <220>
<221>misc_feature
<222> (23) .. (23)
<223>Marcado con BHQ: desactivador de la fluorescencia del tipo de desactivador de hueco negro
- 55 <400> 27
tgggcacaacagacaatcggtg 23
- 60 <210> 28
<211> 243
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>
<223> Porción del locus de IL-4Ralfa murino y secuencia que contiene el gen de IL-4Ralfa

ES 2 656 529 T3

	<400> 28	
5	tggggggaggg aggccatgac acaaatgaaa tggacccccgc tgaccagga tcagcatctg	60
	cccactcttc tttctgcagg caccttttgt gtcccaatg ggggtggcttt gctctgggct	120
	cctgttcct gtgagctgcc tggcctgct gcaggtggca agctctggta agtcaccact	180
10	tctcaatcat tcatttgttg gctattaatg gcgtgccagg gtccctgcagt atgtcacctg	240
	gcc	243
15	<210> 29 <211> 243 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Secuencia de ácido nucleico que contiene la unión corriente abajo de la secuencia de IL-4Ralfa humana y el casete de selección con el gen neo flanqueado por sitios loxP	
	<400> 29	
25	gtcagatcgt ggaggggtctc ggacgaggggt cctgaccctg ggtctccagt cctgggaagt	60
	ggagcccagg ctgtaccatg gctgacctca gctcatggct cccgggctcg ataactataa	120
	cggtcctaag gtagcgactc gagataactt cgtataatgt atgctatacg aagttatatg	180
30	catggcctcc gcgccgggtt ttggcgcctc ccgcccggc cccctcctc acggcgagcg	240
	ctg	243
35	<210> 30 <211> 390 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Porción de la secuencia del casete de selección con el gen neo flanqueado por sitios loxP y el locus de IL-4Ralfa murino	
	<400> 30	
45	tattgttttg ccaagttcta attocatcag acctcgacct gcagccccta gataacttcg	60
	tataatgtat gctatacga gttatcctag gttggagctc tctgtagcca ggtaaccaag	120
50	gggtcccaggg gaacccccag tgtggacgcy gactgcacat gacacagggc ggcctcccca	180
	ttcatgactg tttttctcct tgcagacttc cagctgcccc tgatacagcg ccttccactg	240
	ggggtcacca tctcctgctt ctgcatcccg ttgttttgcc tgttctgtta cttcagcatt	300
55	accaagtgag ttctctgctt ggctgggtgct tctggctggc ccttcagcag tgcctcaga	360
	ggtcacagtc attgtgctgg ctgagaaaag	390
60	<210> 31 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Oligonucleótido sintético	

<400> 31
 ttgactagtaacaagaaggtagca 26

5 <210> 32
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 32
 cctttcccatcacctctaact 23

15 <210> 33
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 33
 25 agctctggtggacaga 16

<210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 34
 35 tctctgccaagctgcttacc 21

<210> 35
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 35
 45 ggctgcatggaagagtgaa 20

<210> 36
 <211> 14
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 36
 ctctccacaaatcg 14

<210> 37
 <211> 25
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 65 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 37
 caggcaggaatagctgagataatct 25

5 <210> 38
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 38
 tgtggagcaaaaagtgggtg at 22

15 <210> 39
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 39
 cctgtgaatagtgataaac 19

25 <210> 40
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 40
 cagttcaaacgataggctcaa 22

35 <210> 41
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 41
 ataattctggaagcatctgtcttc 26

45 <210> 42
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 42
 ctagagctgctagtaaaa 18

55 <210> 43
 <211> 160
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

ES 2 656 529 T3

	<400> 43	
5	atagccaagg ttgcttctga tgacttcagg tccatatagt tggattaatg ttatatttca	60
	atcccacaga aacctgaaaa atgaagccta aatgaagta ttcaaccaac aaaatttcca	120
	cagcaaagtg gaagaacaca gcaagcaaag ccttgtgttt	160
10	<210> 44 <211> 160 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 44	
20	tttatattat tgaataaagt atattttcca aatgtatgtg agactataat gattttatca	60
	tatgatgact caatattctg ctcgagataa cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat	120
25	atgcatggcc tccgcgccgg gttttggcgc ctcccgcggg	160
30	<210> 45 <211> 160 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 45	
	agcccctaga taacttcgta taatgtatgc tatacgaagt tatgctagta actataacgg	60
40	tcctaaggta gcgagctagc cgcctgtgcg ttctgggttg aatgacttaa tgcttccaac	120
	tgaagaaagg gtaacagaga gaaagaaagc cattcttggc	160
45	<210> 46 <211> 237 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 46	
55	tttatattat tgaataaagt atattttcca aatgtatgtg agactataat gattttatca	60
	tatgatgact caatattctg ctcgagataa cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat	120
	gctagtaact ataacggtcc taaggtagcg agctagccgc ctgtgcgttc tgggttgaat	180
60	gacttaatgc ttccaactga agaaagggta acagagagaa agaaagccat tcttggc	237
65		

REIVINDICACIONES

1. Un roedor, que comprende una sustitución de un fragmento genómico de un gen de IL-4R α de roedor en un locus endógeno de IL-4R α de roedor con un fragmento genómico de un gen de IL4-R α humano para formar un gen de IL-4R α humanizado que comprende el codón de iniciación ATG del exón codificante 1 hasta el exón codificante 5 del gen de IL-4R α humano, y los exones codificantes 6-9 del gen de IL-4R α de roedor, en donde el fragmento genómico del gen de IL-4R α de roedor comprende el codón de iniciación ATG del exón codificante 1 hasta el exón codificante 5 del gen de IL-4R α humano, y en donde la expresión del gen de IL4-R α humanizado está bajo el control de elementos reguladores de IL-4R α de roedor en el locus endógeno de IL-4R α de roedor.
2. El roedor de conformidad con la reivindicación 1, en donde el roedor es un ratón o una rata.
3. El roedor de conformidad con la reivindicación 1, en donde el roedor es un ratón que es incapaz de expresar una proteína IL-4R α de ratón.
4. El roedor de conformidad con la reivindicación 1, en donde el roedor expresa una proteína IL-4 humana o humanizada.
5. El roedor de conformidad con la reivindicación 4, en donde el roedor es un ratón que no expresa una proteína IL-4 de ratón.
6. El roedor de conformidad con la reivindicación 1, en donde el roedor comprende una sustitución de un fragmento genómico de un gen de IL-4 de roedor en un locus endógeno de IL-4 de roedor con un fragmento genómico de un gen de IL-4 humano para formar un gen de IL-4 humanizado, en donde el fragmento genómico del gen de IL-4 de roedor comprende el codón de iniciación ATG del exón 1 hasta el exón 4 del gen de IL-4 de roedor, y el fragmento genómico del gen de IL-4 humano comprende el codón de iniciación ATG del exón 1 hasta el exón 4 del gen de IL-4 humano, y en donde la expresión del gen de IL-4 humanizado está bajo el control de elementos reguladores de IL-4 de roedor en el locus endógeno de IL-4 de roedor.
7. El roedor de conformidad con cualquier reivindicación 1-2, 4 y 6 el cual es un ratón.
8. Un método para obtener un roedor humanizado, que comprende sustituir un fragmento genómico de un gen de IL-4R α de roedor en un locus endógeno de IL-4R α de roedor con un fragmento genómico de un gen de IL-4R α humano para formar un gen de IL-4R α humanizado que comprende el codón de iniciación ATG del exón codificante 1 hasta el exón codificante 5 del gen de IL-4R α humano, y los exones codificantes 6-9 del gen de IL-4R α de roedor, en donde el fragmento genómico del gen de IL-4R α de roedor comprende el codón de iniciación ATG del exón codificante 1 hasta el exón codificante 5 del gen de IL-4R α de roedor, y el fragmento genómico del gen de IL-4R α humano comprende el codón de iniciación ATG del gen del exón codificante 1 hasta el exón codificante 5 del gen de IL-4R α humano, y el gen de IL4-R α humanizado se une operativamente a elementos reguladores de IL-4R α de roedor en el locus endógeno de IL-4R α de roedor.
9. El método de conformidad con la reivindicación 8, en donde el roedor es un ratón o una rata.
10. El método de conformidad con la reivindicación 8 o 9, en donde el roedor es un ratón.
11. Un método de tamizaje para un antagonista de IL-4 o IL-4R α específico de humanos, que comprende: proporcionar un roedor doblemente humanizado para IL-4 e IL-4R α como se definió en la reivindicación 6, inducir una inflamación pulmonar en dicho roedor, administrar un agente a dicho roedor, determinar si la inflamación pulmonar se reduce por el agente, e identificar el agente como un antagonista de IL-4 o IL-4R α específico de humanos en base a su capacidad de reducir la inflamación pulmonar, en donde, opcionalmente, el grado de inflamación pulmonar se determina al medir la acumulación de moco en las vías respiratorias, células infiltrantes eosinófilas en un lavado broncoalveolar, y/o IgE circulante total.
12. Un método de tamizaje para un antagonista de IL-4 o IL-4R α específico de humanos, que comprende: proporcionar un roedor doblemente humanizado para IL-4 e IL-4R α como se definió en la reivindicación 6, inducir una inflamación de la piel en dicho roedor, administrar un agente a dicho roedor, determinar si la inflamación de la piel se reduce por el agente, e identificar el agente como un antagonista de IL-4 o IL-4R α específico de humanos en base a su capacidad de reducir la inflamación de la piel.

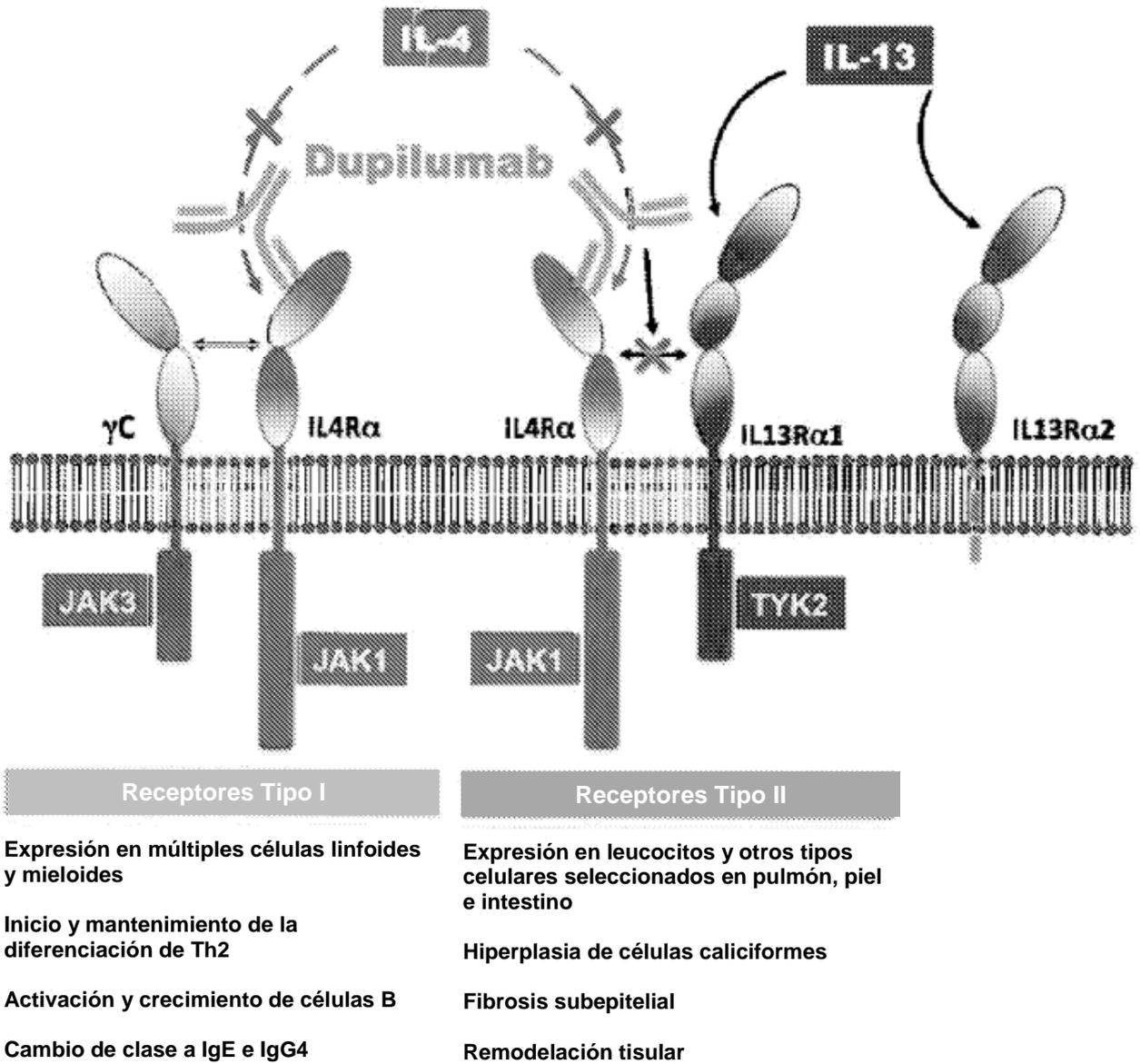
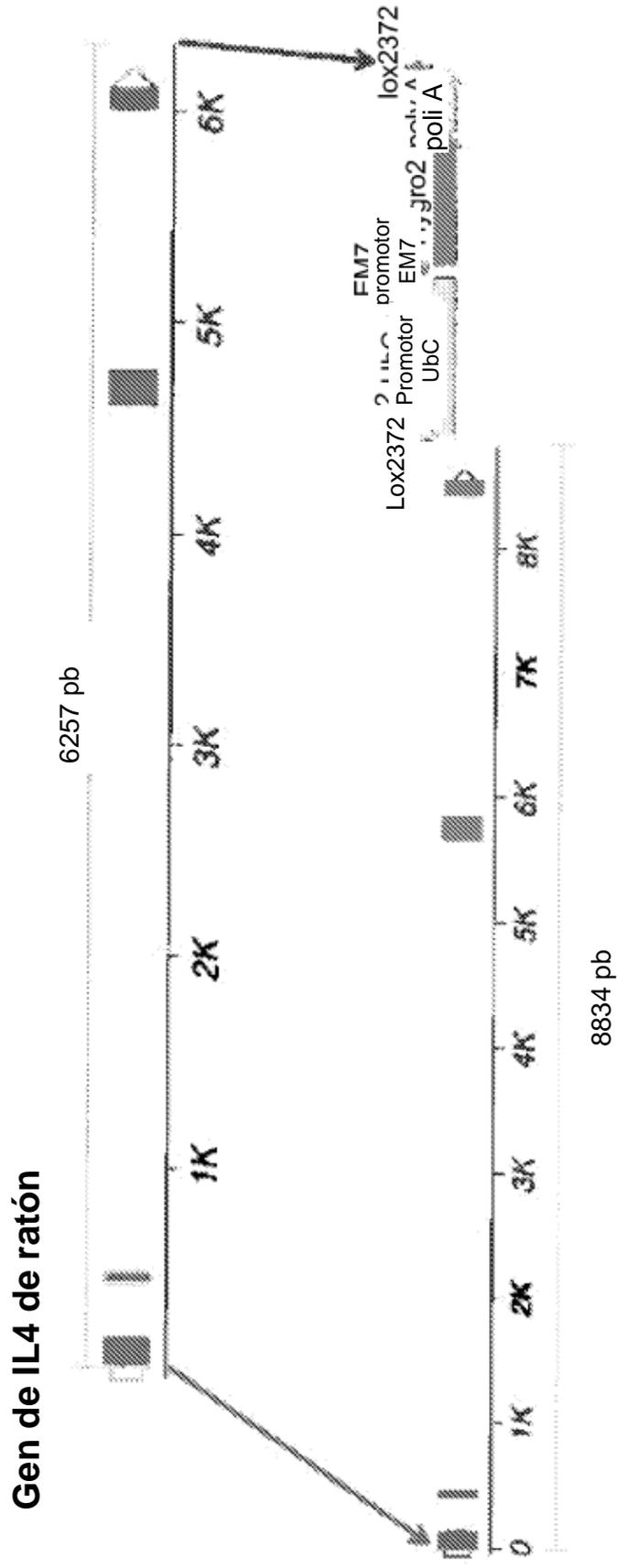


Figura 1

Humanización del locus de *IL4*



Gen de *IL4* humano

Figura 2A

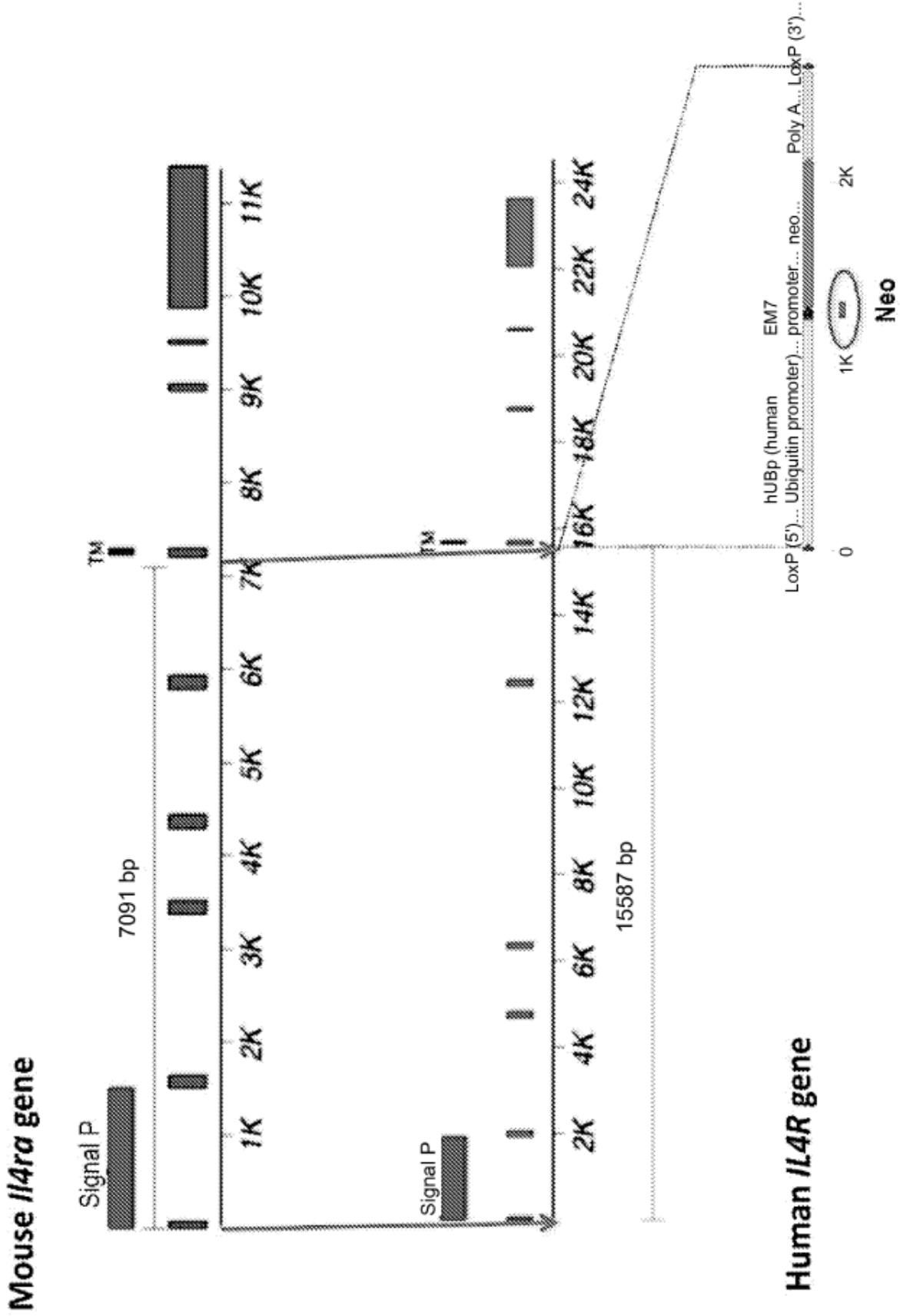


Figure 2B

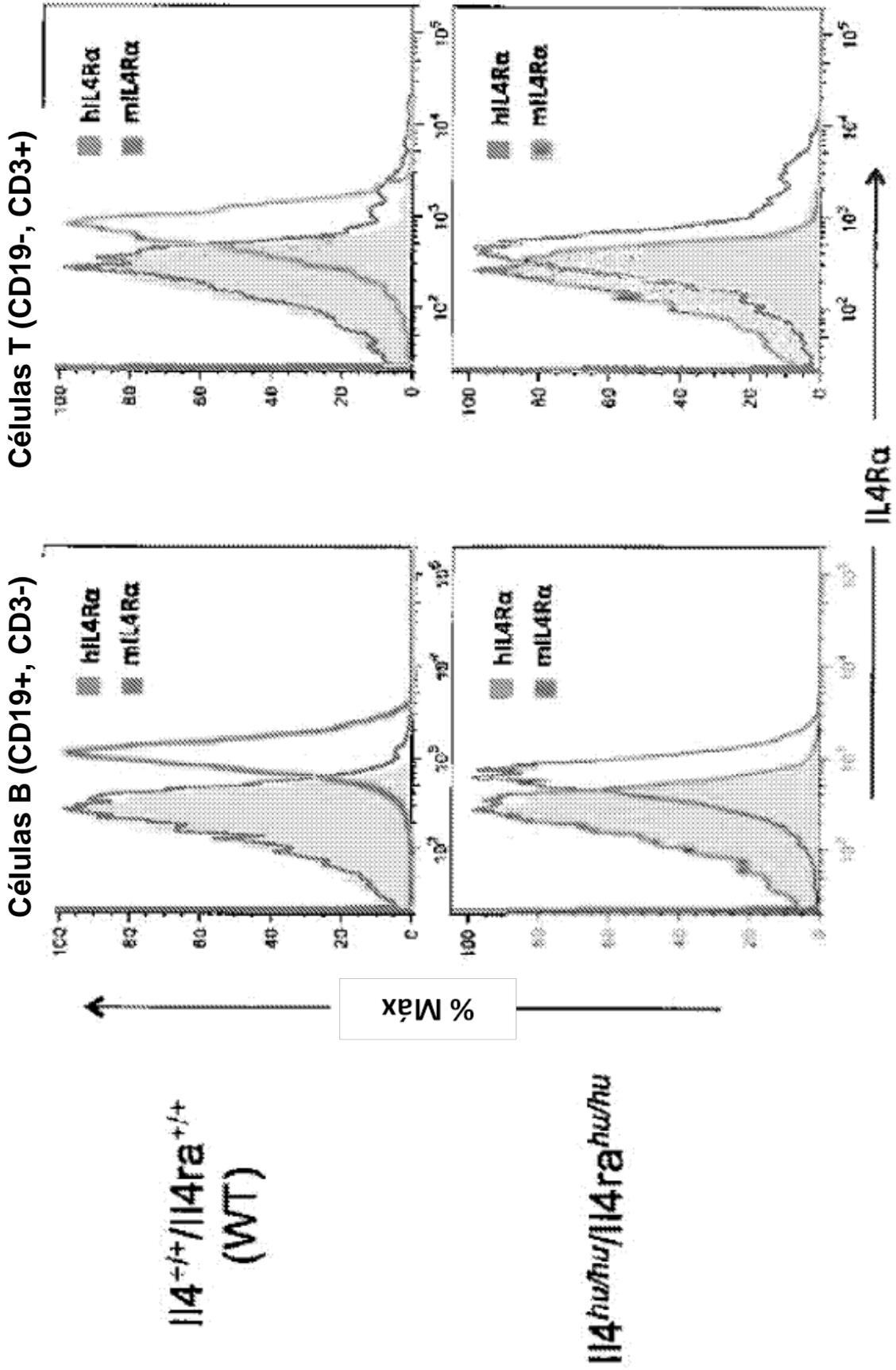


Figura 3

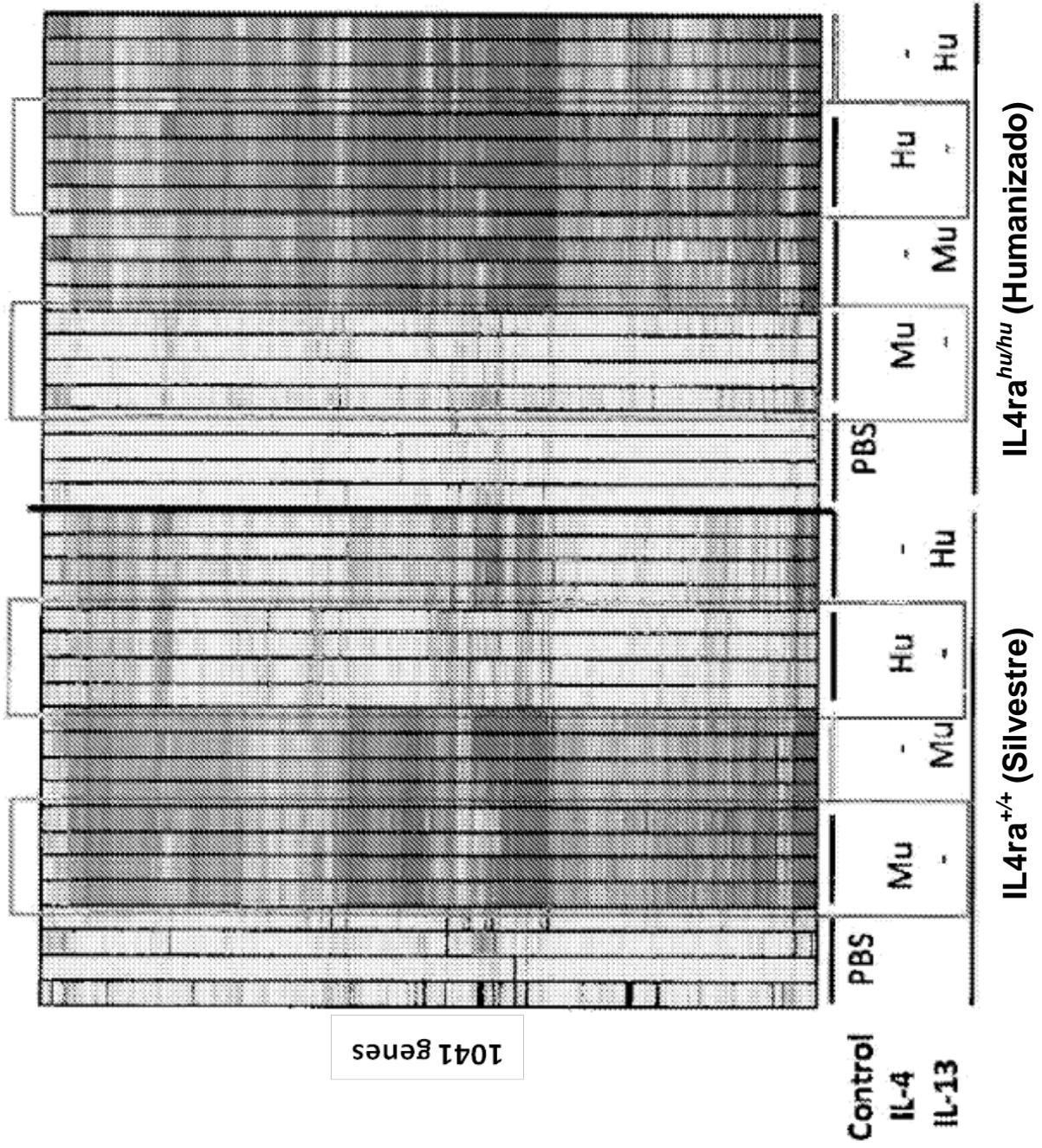


Figura 4

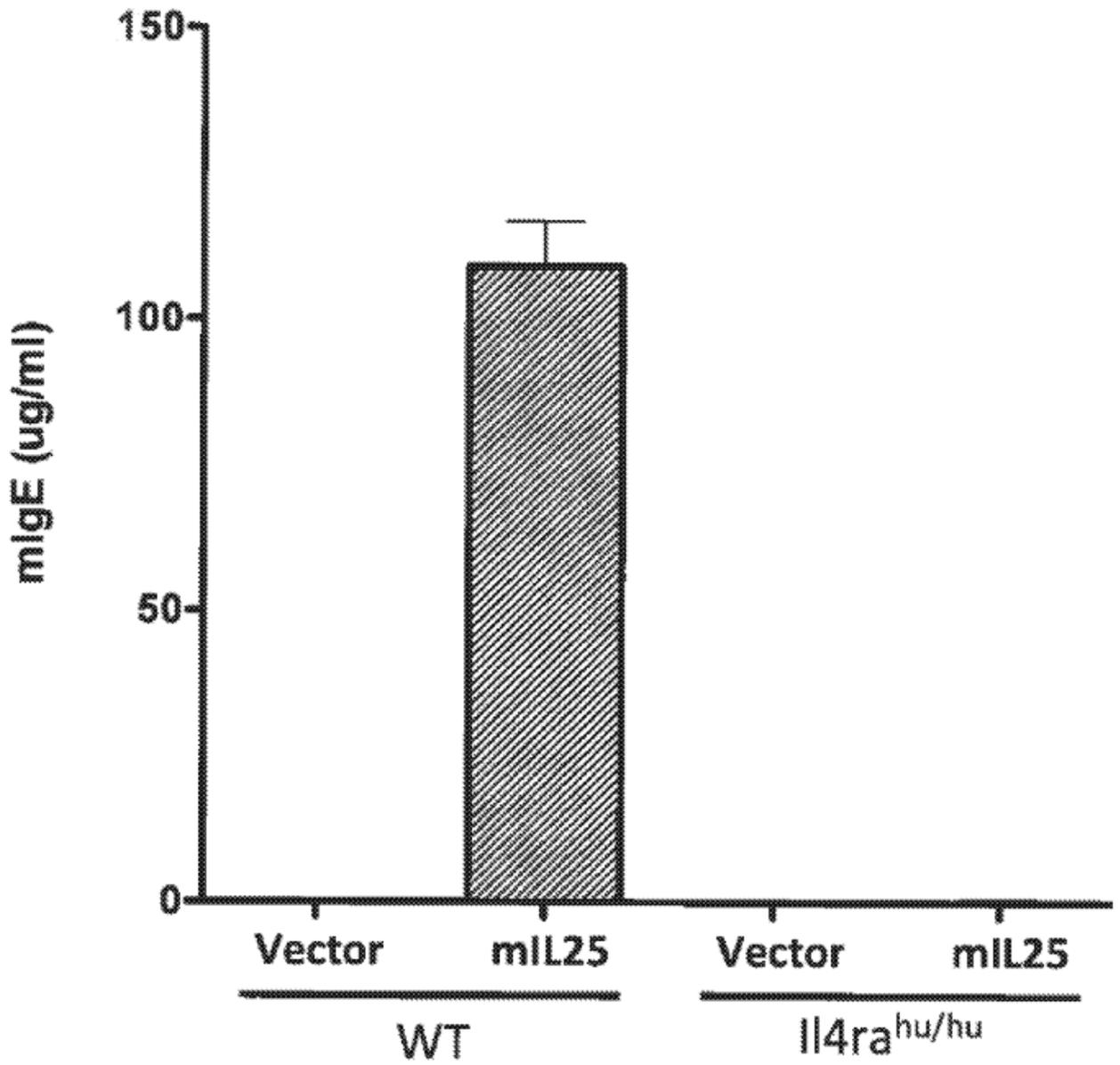


Figura 5

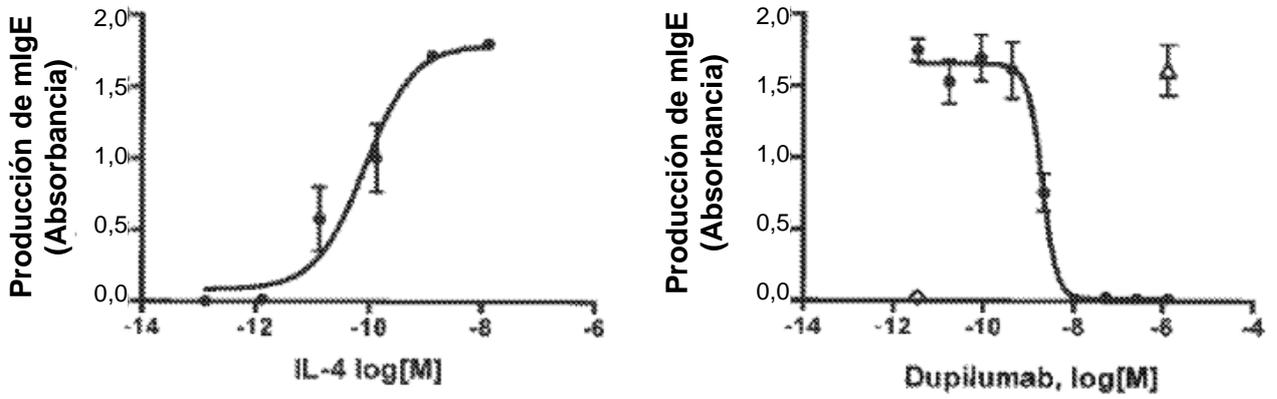


Figura 6

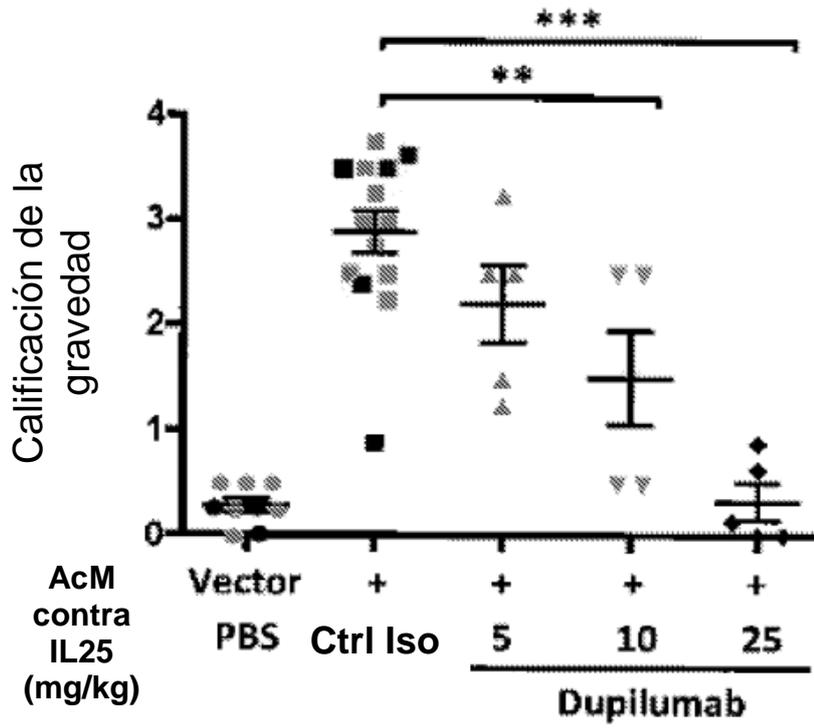
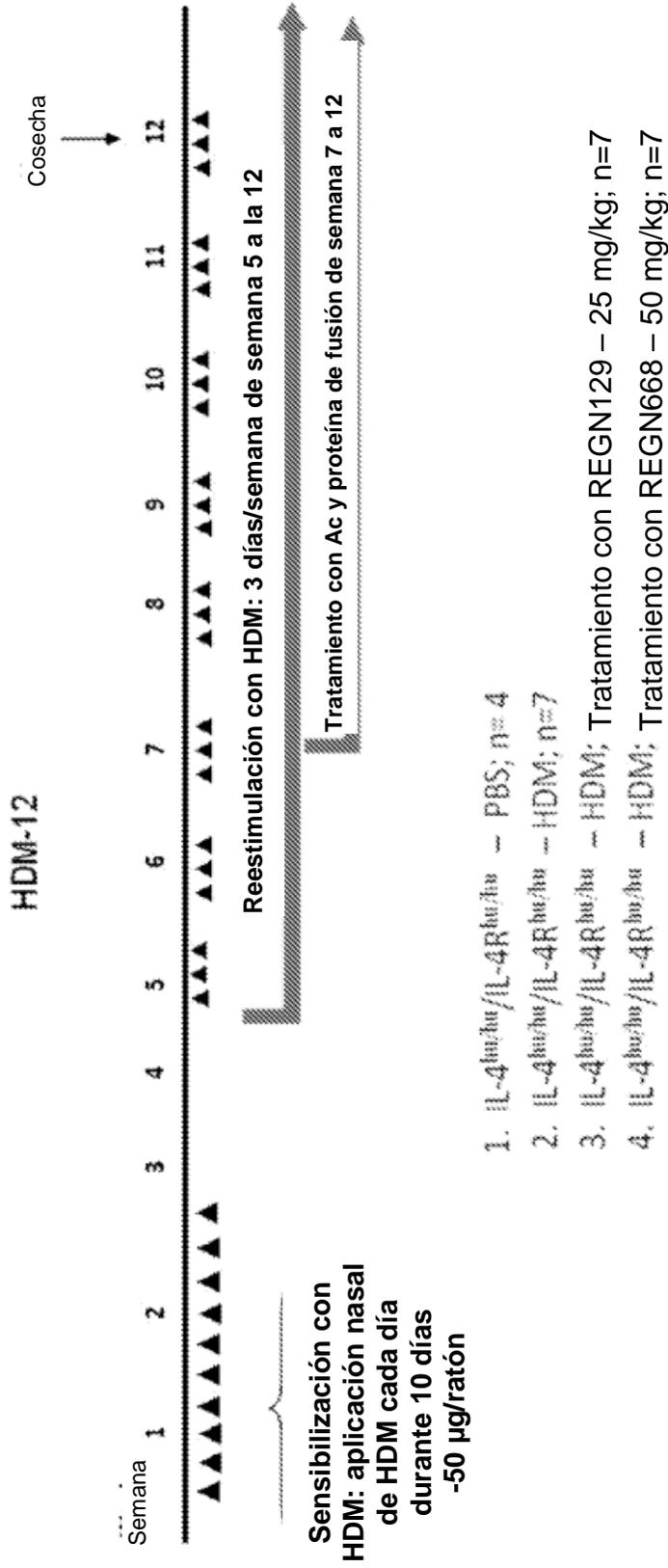


Figura 7

Diseño experimental

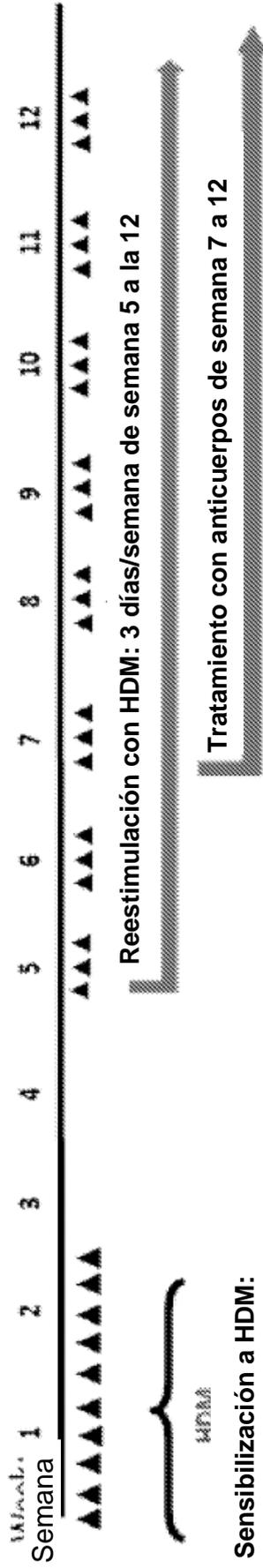


Criterios de valoración final

Deposición de colágeno en pulmones, IgE en suero, IgG1 específica contra HDM, celularidad en BALF, moco e infiltrados pulmonares

Figura 8

HDM-14



Sensibilización a HDM: aplicación nasal cada día durante 10 días

(HDM – aplicación nasal – 50 µg/ratón/dosis)

- A. IL-4^{hu/hu}/IL-4R^{hu/hu} – Solución salina + PBS (n=7)
- C. IL-4^{hu/hu}/IL-4R^{hu/hu} – HDM+REGN668 - dosificación a 25 mg/kg dos veces por semana, con inicio en semana 7 (n=7)
- D. IL-4^{hu/hu}/IL-4R^{hu/hu} – HDM+REGN98 (Control de isotipo)-dosificación a 25 mg/kg dos veces por semana, con inicio en semana 7 (n=7)

Figura 9

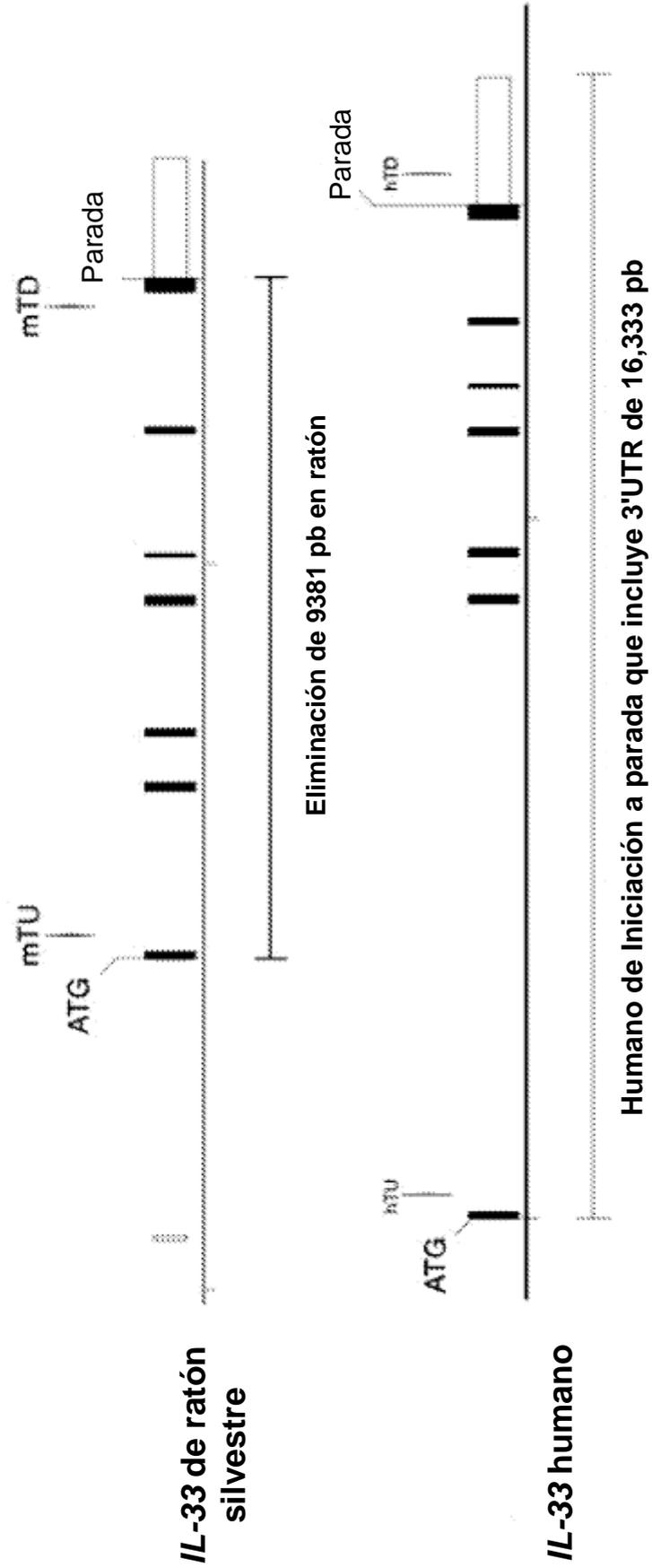


Figura 10A

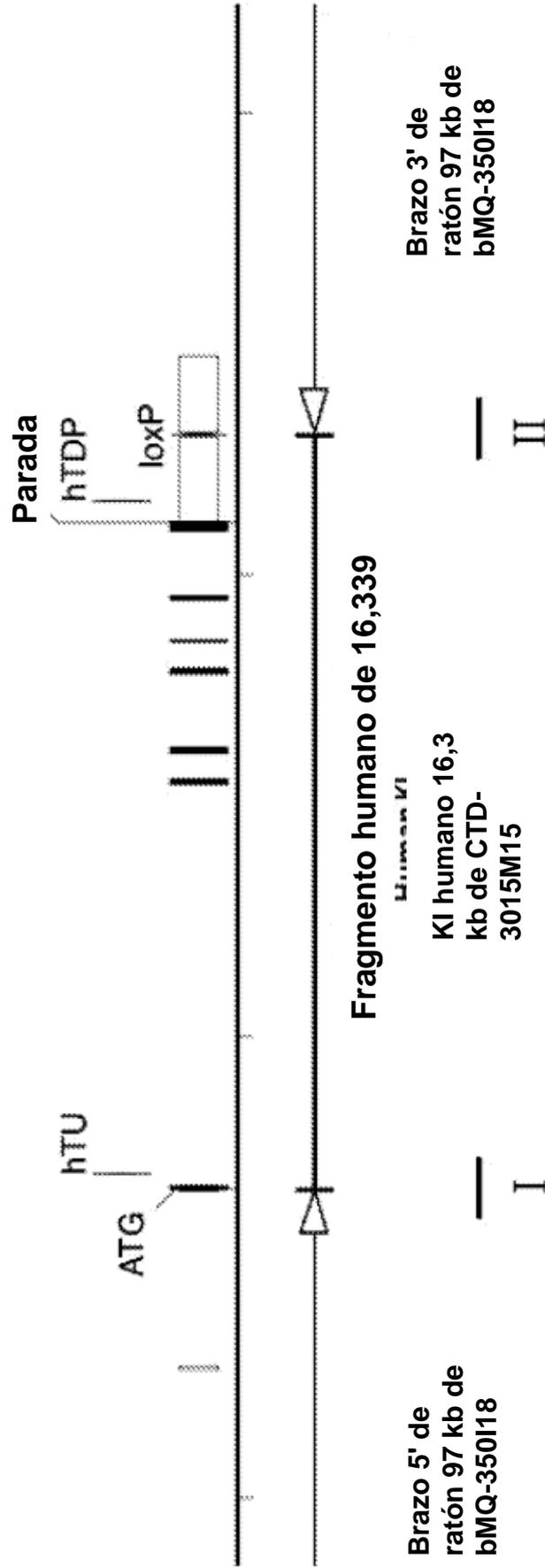


Figura 10C