

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 188**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2010** **PCT/US2010/060925**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011** **WO11084664**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2010** **E 10791039 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018** **EP 2516457**

54 Título: **Ratones Fc gamma R humanizados**

30 Prioridad:

21.12.2009 US 288562 P

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

05.06.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MACDONALD, LYNN;
TU, NAXIN;
GURER, CAGAN;
STEVENS, SEAN y
MURPHY, ANDREW, J.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 671 188 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

Ratones Fc gamma R humanizados

5 Campo de la invención

El campo de la invención es el de los ratones modificados genéticamente que carecen de genes FcγR murinos endógenos, en el que los ratones modificados genéticamente comprenden un reemplazo de genes FcγR endógenos por genes FcγR humanos, y entre los que se incluyen ratones que son capaces de expresar al menos dos, tres, cuatro o cinco genes FcγR humanos funcionales de baja afinidad, y entre los que se incluyen ratones modificados genéticamente que comprenden células inmunes que no expresan genes FcγR endógenos de baja afinidad.

Antecedentes

Los receptores de Fc (FcR) son proteínas que se encuentran en la superficie de las células del sistema inmune que llevan a cabo una variedad de funciones del sistema inmune en los mamíferos. Los FcR existen en una variedad de tipos, en una variedad de células, y median en una variedad de funciones inmunes tales como, por ejemplo, la unión a anticuerpos que están unidos a células infectadas o a patógenos invasores, estimulando a las células fagocíticas o citotóxicas para que destruyan microbios o células infectadas por fagocitosis mediada por anticuerpos o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

La ADCC es un proceso mediante el que las células efectoras del sistema inmune lisan una célula diana unida por anticuerpos. Este proceso depende de la exposición previa a un antígeno o célula foránea, dando lugar a una respuesta de anticuerpos. La ADCC puede mediar a través de células efectoras tales como, por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), mediante la unión de FcR expresado en la superficie de la célula efectora a la parte Fc del anticuerpo que, a su vez, está unido al antígeno o célula foránea. Debido al papel central que desempeñan los FcR en la respuesta inmune, se necesitan animales no humanos útiles que expresen conjuntamente múltiples FcR humanos, incluyendo animales no humanos que expresen conjuntamente múltiples FcR humanos de baja afinidad. Existe la necesidad de modelos animales no humanos de la función de los FcR humanos y procesos humanos de ADCC para el estudio y la elucidación de tratamientos de enfermedades humanas, en particular, tratamientos antitumorales y terapias para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, y desarrollo de fármacos farmacéuticos, en particular, en el desarrollo, diseño y prueba de productos farmacéuticos de anticuerpos humanos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación esquemática de un locus de FcγR de baja afinidad de tipo silvestre en un ratón, que muestra genes FcγRIIB, FcγRIV y FcγRIII de ratón y un vector de dirección a FcγR de ratón usado para una eliminación dirigida de estos genes, lo que incluye un casete de neomicina flanqueado por sitios de recombinación específica del sitio.

La Figura 2 muestra histogramas de esplenocitos seleccionados para los linfocitos B (anti-CD19), linfocitos NK (anti-NKp46) y macrófagos (anti-F4/80) incluyendo la expresión de genes mFcγRII y mFcγRIII endógenos para ratones deficientes en genes de cadena α FcγR de tipo silvestre y de baja afinidad (mFcγR KO).

Las Figuras 3A-3D muestran el agotamiento *in vivo* de los linfocitos B con un anticuerpo humano anti-CD20 humana con Fc de ratón (Ab 168) o Fc humano (Ab 735) en ratones CD20 humanizados (hCD20) y ratones CD20 humanizados cruzados con ratones con FcγR desactivado (hCD20/FcγR KO) en varios compartimentos linfocíticos: médula ósea (Figura 3A), sangre (Figura 3B), ganglio linfático (Figura 3C) y bazo (Figura 3D). Para cada gráfico, el eje y muestra el porcentaje de linfocitos B seleccionados (B220⁺/IgM⁺ o B220⁺/CD19⁺), y el eje x muestra la dosis de anticuerpo para cada grupo de animales: 10 mg/kg de anticuerpo de control (C), 2 mg/kg de anticuerpo humano anti-CD20 humana (2 Ab) y 10 mg/kg de anticuerpo humano anti-CD20 humana (10 Ab).

La Figura 4 es una representación esquemática de una eliminación dirigida a la neomicina del locus de FcγR de ratón de baja afinidad y un segundo vector de dirección para introducir dos genes FcγR de baja afinidad humanos (hFcγRIIIA y hFcγRIIA) en el locus de ratón eliminado, lo que incluye un casete de higromicina flanqueado por sitios de recombinación específica del sitio. Para la expresión de hFcγRIIA en plaquetas, se emplea una región promotora extendida unida operativamente al gen hFcγRIIA del vector de dirección FcγRIIIA-IIA; para evitar la expresión de hFcγRIIA en las plaquetas, se omite o se omite sustancialmente la región promotora.

La Figura 5A muestra histogramas de esplenocitos seleccionados para los linfocitos NK (anti-NKp46) y macrófagos (anti-F4/80) que incluyen la expresión de FcγRIIIA humano para ratones homocigotos para FcγRIIIA-IIA de tipo silvestre y humano (HO para FcγRIIIA/FcγRIIA humanos).

La Figura 5B muestra histogramas de esplenocitos seleccionados para los neutrófilos (anti-Ly6G) y macrófagos (anti-F4/80), incluyendo la expresión de FcγRIIA humano para ratones homocigotos para FcγRIIIA-IIA de tipo silvestre y humano (HO para FcγRIIIA humano/FcγRIIA).

La Figura 6 es una representación esquemática de una eliminación dirigida a la higromicina del locus de FcγR de ratón de baja afinidad, que incluye una introducción de dos genes FcγR humanos de baja afinidad (hFcγRIIA y hFcγRIIB) y un tercer vector de dirección para introducir tres genes FcγR humanos de baja afinidad adicionales (hFcγRIIB, hFcγRIIB y hFcγRIIC) y un casete de neomicina flanqueado por sitios de recombinación específica del sitio.

La Figura 7 muestra histogramas de esplenocitos seleccionados para los linfocitos NK (anti-CD19) y neutrófilos (anti-Ly6G) que incluyen la expresión de FcγRIIB humano y FcγRIIB humano para ratones homocigotos para FcγRIIA-IIB-IIA-IIB-IIC humanos (HO para FcγRIIA/FcγRIIB/FcγRIIA/FcγRIIB/FcγRIIC humanos) y de tipo silvestre.

Sumario

Se desvelan células de ratón, embriones de ratón, ratones modificados genéticamente, y métodos y composiciones para su preparación y uso. En diversos aspectos, los ratones comprenden un reemplazo de un receptor de FcγR endógeno por un receptor de FcγR humano en un locus de FcγR de baja afinidad de ratón endógeno.

En un aspecto, se proporciona un ratón que comprende una modificación genética, en el que la modificación genética comprende un reemplazo de un fragmento genómico del locus de gen FcγR de baja afinidad de ratón endógeno, en la que dicho fragmento genómico comprende los genes de ratón que codifican las subunidades α de FcγRIIB, FcγRIV y FcγRIII, con un fragmento genómico humano que codifica al menos dos genes FcγR humanos de baja afinidad seleccionados entre FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIA y FcγRIIB, y en el que el ratón comprende una cadena γ de FcR funcional.

En una realización, la cadena γ de FcR funcional es una cadena γ de FcR de ratón. En una realización, la cadena γ de FcR de ratón es una cadena γ de FcR endógena al ratón.

En una realización, los ratones expresan una cadena α funcional de un receptor FcγR de baja afinidad humano y una cadena γ de FcR de ratón endógena funcional.

En un aspecto, el ratón modificado genéticamente proporcionado no expresa una cadena α de FcγRIV funcional, y no expresa una cadena α de FcγRIII funcional; en el que el ratón expresa una cadena γ de ratón endógena funcional.

En una realización, el genoma de ratón comprende una eliminación de una cadena α de FcγRIIB endógena, una eliminación de una cadena α de FcγRIV endógena y una eliminación de una cadena α de FcγRIII endógena.

En una realización, el ratón comprende una eliminación de una cadena α de FcγRIIB endógena, una eliminación de una cadena α de FcγRIV endógena y una eliminación de una cadena α de FcγRIII endógena, y además comprende una capacidad reducida de crear una respuesta inmune hacia un antígeno en comparación con la capacidad de un ratón de tipo silvestre con respecto al mismo antígeno. En una realización, la respuesta inmune reducida incluye una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). En una realización, la respuesta inmune reducida incluye una capacidad reducida en un ensayo de destrucción celular de lograr la destrucción de los linfocitos NK dependiente de anticuerpos. En realizaciones específicas, la reducción de la ADCC o destrucción de linfocitos NK dependiente de anticuerpos es del al menos 50 %, en una realización, del al menos 75 %, en una realización, del al menos 90 %.

En una realización, el ratón comprende una eliminación de una cadena α de FcγRIIB endógena, una eliminación de una cadena α de FcγRIV endógena y una eliminación de una cadena α de FcγRIII endógena, y además comprende una mayor respuesta de anticuerpos humores tras la inmunización con un antígeno en comparación con el ratón de tipo silvestre, por ejemplo, un ratón de la misma cepa o de una cepa similar que no comprende la eliminación. En una realización, el aumento de la respuesta de anticuerpos humores es del doble en comparación con un ratón de tipo silvestre. En una realización, el aumento de la respuesta de anticuerpos humores es del triple en comparación con un ratón de tipo silvestre. En una realización, el aumento de la respuesta de anticuerpos humores es de 5 veces en comparación con un ratón de tipo silvestre. En una realización, el aumento de la respuesta de anticuerpos humores es de 7 veces en comparación con un ratón de tipo silvestre. En una realización, el aumento de la respuesta de anticuerpos humores es de 10 veces en comparación con un ratón de tipo silvestre. En una realización específica, la respuesta de anticuerpos humores se mide en microgramos de anticuerpo que se une específicamente a un antígeno (con el que se ha inmunizado al ratón) por microgramo de proteína sérica del ratón. En una realización, el aumento de la respuesta de anticuerpos humores es con respecto a un antígeno hacia el que un ratón de tipo silvestre presenta tolerancia, o a un antígeno que, en un ratón de tipo silvestre, presenta una respuesta inmune humoral baja o mínima. En una realización específica, el antígeno es un antígeno de ratón. En una realización específica, el antígeno es un antígeno humano que presenta una identidad con una proteína de ratón del al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %.

El ratón modificado genéticamente proporcionado comprende un reemplazo de genes de cadena α de FcγR de ratón de baja afinidad por un gen de cadena α de FcγR humano de baja afinidad, en el que el reemplazo es en el locus de

gen de cadena α Fc γ R de ratón endógena. Los genes de cadena α de Fc γ R de ratón de baja afinidad son un gen de cadena α de Fc γ RIIB, Fc γ RIV y Fc γ RIII. En una realización específica, se proporciona un ratón modificado genéticamente, en la que el ratón expresa una cadena γ de FcR endógena y en la que el gen de cadena α de Fc γ R humano de baja afinidad es la cadena α de Fc γ RIIIA. En otra realización específica, el ratón modificado genéticamente expresa una cadena γ de FcR endógena y una cadena α de Fc γ RIIIA humano funcional en linfocitos NK. En una realización específica, la funcionalidad de la cadena α de Fc γ RIIIA en los linfocitos NK se refleja en la destrucción de NK mediada por anticuerpos humanos (por ejemplo, ADCC mediada por un anticuerpo humano).

En un aspecto, se proporciona una célula, un embrión o un animal no humano modificados genéticamente, en el que la modificación genética comprende un reemplazo de al menos un gen de cadena α de Fc γ R endógena de baja afinidad por un gen de cadena α de Fc γ R humano, y la célula, el embrión o el animal expresan una cadena γ de FcR funcional. En una realización, la cadena γ de FcR funcional es una cadena γ de FcR endógena. En una realización, el gen de cadena α de Fc γ R humano de baja afinidad se selecciona entre un gen de cadena α de Fc γ RIIA, un gen de cadena α de Fc γ RIIIA y una combinación de los mismos. En una realización específica, el gen Fc γ RIIA humano comprende un polimorfismo, en la que el polimorfismo se selecciona entre un polimorfismo de baja respuesta de 131 His y un polimorfismo de alta respuesta de 131Arg. En una realización específica, el polimorfismo de Fc γ RIIA es el polimorfismo de baja respuesta de 131 His. En una realización, el gen Fc γ RIIIA es una variante alélica específica, en la que la variante alélica se selecciona entre una variante de 158Val y una variante de 158Phe. En una realización específica, la variante alélica de Fc γ RIIIA es la variante de 158Val.

En una realización, el gen Fc γ R humano de baja afinidad se selecciona entre un gen Fc γ RIIB, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIB, y una combinación de los mismos. En una realización específica, el gen Fc γ RIIB humano comprende una sustitución de aminoácido, en la que la sustitución se selecciona entre una sustitución de 232Ile y una sustitución de 232Thr. En otra realización específica, la sustitución de aminoácido es una sustitución de 232Ile. En una realización específica, el gen Fc γ RIIIB es una variante alélica específica, en la que la variante alélica se selecciona entre una variante de NA1 y una variante de NA2. En otra realización específica, la variante alélica de Fc γ RIIIB es la variante de NA2.

En una realización, los genes de cadena α de Fc γ R humano de baja afinidad se seleccionan entre un gen de cadena α de Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB, y una combinación de los mismos.

En una realización, el gen de cadena α de Fc γ RIV de ratón de baja afinidad y el gen de cadena α de Fc γ RIII están reemplazados por al menos dos genes de cadena α de Fc γ R humanos de baja afinidad. En una realización, el gen de cadena α de Fc γ RIV de ratón de baja afinidad y el gen de la cadena α de Fc γ RIIB están reemplazados por al menos dos genes de cadena α de Fc γ R humano de baja afinidad. En una realización, el gen de cadena α Fc γ RIIB de ratón de baja afinidad y el gen de cadena α Fc γ RIII están reemplazados por al menos dos genes de cadena α Fc γ R humanos de baja afinidad. En una realización específica, los al menos dos genes de cadena α de Fc γ R humano de baja afinidad se seleccionan entre un gen de cadena α de Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB, y una combinación de los mismos. En otra realización específica, los al menos dos genes de cadena α de Fc γ R humano de baja afinidad se seleccionan entre un gen de cadena α de Fc γ RIIA, un gen de cadena α de Fc γ RIIIA y una combinación de los mismos. En otra realización específica, los al menos dos genes de cadena α de Fc γ R humano de baja afinidad se seleccionan entre un gen de cadena α de Fc γ RIIB, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIB, y una combinación de los mismos. En otra realización específica, los genes Fc γ R de ratón de baja afinidad están reemplazados por un gen de cadena α Fc γ RIIA y un gen de cadena α Fc γ RIIIA humano. En otra realización específica, los genes de cadena α Fc γ RIIA y Fc γ RIIIA humanos de baja afinidad comprenden variantes, en la que el gen de la cadena α Fc γ RIIA comprende una variante de 131 His y el gen de la cadena α Fc γ RIIIA comprende una variante de 158Val. En otra realización específica, los genes de cadena α de Fc γ R de ratón de baja afinidad están reemplazados por los siguientes genes de cadena α de Fc γ R humanos de baja afinidad: Fc γ RIIB, Fc γ RIIC y Fc γ RIIIB. En otra realización específica, el gen de cadena α de Fc γ RIIB y el gen de cadena α de Fc γ RIIIB humanos de baja afinidad comprenden variantes, en la que el gen de la cadena α de Fc γ RIIB comprende una variante de 232Ile y el gen de la cadena α de Fc γ RIIIB comprende una variante de NA2.

En una realización, las modificaciones genéticas comprenden un reemplazo de secuencias genómicas sintéticas del cromosoma de ratón y humano 1. En una realización específica, las modificaciones genéticas comprenden un reemplazo de un fragmento genómico que comprende genes Fc γ R de ratón endógenos de baja afinidad con un fragmento genómico que comprende genes Fc γ R humanos de baja afinidad. En otra realización específica, el genoma del ratón del cromosoma 1:172.889.983 al cromosoma 1:172.989.911 se reemplaza por un fragmento genómico humano que comprende el cromosoma humano 1:161.474.729 al cromosoma 1:161.620.458.

También se desvela una célula, un embrión no humano o un animal no humano modificados genéticamente, en los que la modificación genética comprende una desactivación de uno o más genes endógenos de cadena α de receptor de baja afinidad, y la presencia de un episoma que comprende uno o más genes de cadena α de Fc γ R humanos. En un caso específico, la célula, el embrión o el animal expresan una cadena γ de FcR funcional. En un caso específico, el episoma es un mini cromosoma. En un caso, la cadena γ de FcR funcional es endógena a la célula, el embrión o el animal.

En un aspecto, se proporciona un ratón modificado genéticamente, en el que la modificación genética comprende un

reemplazo de un fragmento genómico del locus de gen FcγR de baja afinidad de ratón endógeno, en el que dicho fragmento genómico comprende los genes de ratón que codifican las subunidades α de FcγRIIB, FcγRIII y FcγRIV, con un fragmento genómico humano que codifica al menos dos genes FcγR humanos de baja afinidad, en el que los al menos dos genes FcγR humanos de baja afinidad comprenden un gen que codifica una subunidad α de FcγRIIIA humano, en el que el ratón expresa una proteína FcγRIIIA humana asociada con una subunidad γ de FcR endógena de ratón, en el que la proteína FcγRIIIA humana se expresa en la superficie de un linfocito NK de ratón. En una realización, el receptor FcγR de baja afinidad funcional se expresa en un tipo de célula en el que el receptor FcγR de baja afinidad se expresa en seres humanos. El receptor FcγR de baja afinidad funcional humano es FcγRIIIA, y FcγRIIIA se expresa en linfocitos NK.

El ratón comprende un reemplazo de tres genes de cadena α de FcγR de ratón por al menos dos genes de cadena α de FcγR humanos. En otra realización específica, los tres genes de cadena α de FcγR de ratón están reemplazados por tres genes de cadena α de FcγR humanos.

Los genes de cadena α de FcγR de ratón de baja afinidad son un gen de cadena α de FcγRIIB, FcγRIV y FcγRIII.

En una realización, los al menos dos genes de cadena α de FcγR humanos de baja afinidad se seleccionan entre un gen de cadena α de FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA, FcγRIIIB, y una combinación de los mismos, en el que los al menos dos genes FcγR humanos de baja afinidad comprenden un gen que codifica una subunidad α de FcγRIII humano. En una realización, el gen de cadena α de FcγR humano de baja afinidad se selecciona entre una FcγRIIA, un gen de cadena α FcγRIIIA y una combinación de los mismos, en el que los al menos dos genes FcγR humanos de baja afinidad comprenden un gen que codifica una subunidad α de FcγRIII humano. En una realización, el gen de cadena α de FcγR humano de baja afinidad se selecciona entre una FcγRIIB, FcγRIIC, un gen de cadena α de FcγRIIIB y una combinación de los mismos, en el que los al menos dos genes FcγR humanos de baja afinidad comprenden un gen que codifica una subunidad α de FcγRIII humano.

En otra realización específica, los genes de cadena α de ratón están reemplazados por los siguientes genes de cadena α de FcγR humanos: FcγRIIA y FcγRIIIA. En otra realización específica más, los genes de cadena α de ratón están reemplazados por los siguientes genes de cadena α de FcγR humanos: FcγRIIB, FcγRIIC y FcγRIIIB.

En un aspecto, el ratón modificado genéticamente proporcionado comprende una cadena α de FcγR humano de baja afinidad y una subunidad de cadena γ de FcR de ratón, en el que el ratón expresa la cadena α de FcγR humano en una célula seleccionada entre un neutrófilo, un eosinófilo, un basófilo, un monocito, un macrófago, una plaqueta, una célula de Langerhans, una célula dendrítica, un linfocito NK, un mastocito, un linfocito B, un linfocito T y una combinación de los mismos. En una realización, el ratón expresa una cadena α de FcγRIIA humano en una célula seleccionada entre un neutrófilo, un macrófago, un eosinófilo, una plaqueta, una célula dendrítica, una célula de Langerhans y una combinación de los mismos. En una realización, el ratón es capaz de la fagocitosis, la ADCC y la activación celular iniciada o mediada a través de la cadena α de FcγRIIA humano expresada. En una realización, el ratón expresa una cadena α de FcγRIIIA humano en una célula seleccionada entre un macrófago, un linfocito NK, un monocito, un mastocito, un eosinófilo, una célula dendrítica, una célula de Langerhans, al menos un tipo de linfocito T y una combinación de los mismos. En una realización, el ratón es capaz de la ADCC mediada a través de la cadena α de FcγRIIIA humano expresada en linfocitos NK. En una realización específica, el ratón presenta ADCC mediada por hFcγRIIIA en respuesta a un anticuerpo que comprende un Fc humano.

En una realización, el ratón expresa tanto una cadena α de FcγRIIA humano como una cadena α de FcγRIIIA humano. En una realización, la cadena α de FcγRIIA humano se expresa en las plaquetas y la cadena α de FcγRIIIA humano se expresa en los linfocitos NK. En una realización, el ratón es capaz de la ADCC mediada por un anticuerpo que comprende un Fc humano, en la que la mediación es a través de bien la cadena α de FcγRIIA humano o a través de la cadena α de FcγRIIIA humano expresadas en la superficie de células auxiliares. En una realización, la cadena α de FcγRIIA humano no se expresa en las plaquetas. En una realización específica en la que la cadena α de FcγRIIA humano no se expresa en las plaquetas, el ratón carece o carece esencialmente de una secuencia promotora humana que se una operativamente a la cadena α de FcγRIIA humano en un genoma humano.

En una realización, el ratón expresa una cadena α de FcγRIIB humano en una célula seleccionada entre un linfocito B, un mastocito, un basófilo, un macrófago, un eosinófilo, un neutrófilo, una célula dendrítica, una célula de Langerhans y una combinación de los mismos. En una realización específica, el ratón expresa una cadena α de FcγRIIB humano en un linfocito B o un mastocito. En otra realización específica, el ratón es capaz de la endocitosis de complejos inmunes mediada a través de la cadena α de FcγRIIB humano. En una realización, el ratón expresa una cadena α de FcγRIIC humano en una célula seleccionada entre un neutrófilo, un macrófago, un eosinófilo, una plaqueta, una célula dendrítica, una célula de Langerhans y una combinación de los mismos. En una realización específica, el ratón es capaz de la fagocitosis, la ADCC y la activación celular iniciada a través de la cadena α de FcγRIIC humano expresada.

En una realización, el ratón expresa una cadena α de FcγRIIB humano en un linfocito B o un mastocito. En una realización específica, el ratón es capaz de la activación celular, la fagocitosis, la ADCC y la desgranulación, en la que la activación, la fagocitosis, la ADCC y la desgranulación están mediadas a través de la cadena α de FcγRIIB

humano expresada.

En un aspecto, el ratón proporcionado comprende una eliminación de los genes FcγRIIB, FcγRIV y FcγRIII endógenos y la inserción de los genes FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA y FcγRIIIB humanos, comprendiendo el ratón un gen de la cadena γ de FcR de ratón funcional.

En una realización, El ratón comprende la eliminación de las cadenas α codificadas por los genes FcγRIIB, FcγRIV y FcγRIII endógenos y la inserción de las cadenas α codificadas por los genes FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA y FcγRIIIB humanos.

La inserción de los genes de las cadenas α de FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA y FcγRIIIB humanos es en el locus de la cadena α de FcγR de baja afinidad de ratón endógeno.

En una realización, el ratón expresa FcγRIIIA humano en linfocitos NK y macrófagos. En una realización específica, todos o esencialmente todos los linfocitos NK de una muestra de esplenocitos del ratón expresan FcγRIIIA humano. En una realización específica, todos o esencialmente todos los macrófagos de una muestra de esplenocitos del ratón expresan FcγRIIIA humano.

En una realización, el ratón expresa un FcγR humano seleccionado entre FcγRIIA humano, un FcγRIIIA humano y una combinación de los mismos, en un tipo de célula seleccionado entre neutrófilos, macrófagos y una combinación de los mismos. En una realización específica, el ratón expresa FcγRIIA humano y FcγRIIIA humano en todos o esencialmente todos los neutrófilos y macrófagos de una muestra de esplenocitos del ratón.

En una realización, el ratón expresa FcγRIIB humano y FcγRIIIB humano en los linfocitos B y neutrófilos de los linfocitos B de una muestra de esplenocitos seleccionados para los linfocitos B del ratón. En una realización específica, el ratón expresa FcγRIIIB y FcγRIIB en todos o esencialmente todos los linfocitos B y neutrófilos de una muestra de esplenocitos seleccionados para los linfocitos B del ratón.

En una realización, el ratón comprende además un gen CD20 humanizado. En una realización, el ratón que comprende además el gen CD20 humanizado tras el tratamiento con una proteína de unión anti-CD20 que comprende un Fc muestra agotamiento (*in vivo*) de los linfocitos B. En una realización, el agotamiento está en un compartimento seleccionado entre médula ósea, sangre, ganglio linfático, bazo y una combinación de los mismos. En una realización, el Fc es un Fc humano. En una realización, el Fc es un Fc de ratón. En una realización, la proteína de unión anti-CD20 es un anticuerpo anti-CD20.

También se desvela una célula que comprende una modificación genética según lo descrito en el presente documento. En un caso, la célula se selecciona entre una célula madre embrionaria (ES), una célula pluripotente, una célula pluripotente inducida y una célula totipotente. En un caso específico, la célula es una célula ES. En un caso más específico, la célula es una célula ES de ratón.

En un aspecto, se proporciona un embrión de ratón, que comprende una modificación genética según lo descrito en el presente documento.

En un aspecto, se proporciona un método de determinación de la eficacia de un agente terapéutico, en el que el agente terapéutico es un anticuerpo (por ejemplo, mono-, bi-, tri-, multiespecífico) que comprende un Fc humano. En una realización, el agente terapéutico es un anticuerpo humano. La eficacia es la eficacia de la destrucción celular mediada por el agente terapéutico (por ejemplo, ADCC). En una realización específica, el agente terapéutico humano es una proteína de fusión que comprende un Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina humana. El agente terapéutico se administra a un ratón como se describe en el presente documento, y se mide un nivel de ADCC dependiente del agente terapéutico. En una realización, el ratón se usa para evaluar la actividad ADCC de un agente terapéutico mediante la administración del agente terapéutico al ratón y luego la detección (por ejemplo, *in vitro* en una muestra (por ejemplo, sangre) tomada del animal) la unión del agente terapéutico a un FcγR de baja afinidad humano en una célula con expresión de FcγR. En una realización específica, se aíslan células auxiliares del ratón y se ensayan para determinar la capacidad, en presencia o ausencia del agente terapéutico, de mediar la ADCC dependiente del agente terapéutico. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método de medición de la destrucción celular dependiente de anticuerpos, que comprende:

- (a) administrar al ratón modificado genéticamente de la reivindicación 7 un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a una célula diana que no es un linfocito NK en el ratón, en el que el anticuerpo terapéutico comprende un Fc humano;
- (b) medir un nivel de destrucción de células diana mediada por NK en el ratón o en una muestra de tejido del ratón; y
- (c) determinar la cantidad de destrucción de células diana que está mediada por el anticuerpo terapéutico, midiendo de ese modo la destrucción celular dependiente de anticuerpos.

También se desvela un método para determinar si un FcγR de baja afinidad se asocia con una enfermedad o con un

trastorno humanos, que comprende una etapa de determinar un rasgo asociado con la enfermedad o con el trastorno humanos en un ratón de acuerdo a la invención. En un caso, el rasgo es un fenotipo asociado con la ausencia o pérdida de una función de uno o más FcγR de baja afinidad. En un caso específico, la enfermedad o el trastorno es una enfermedad o un trastorno autoinmune. En un caso específico, la enfermedad o el trastorno autoinmune se selecciona entre Artritis Reumatoide (AR), Lupus Eritematoso Diseminado (LED), diabetes de tipo I, síndrome de Guillain-Barre, esclerosis, esclerosis múltiple, Síndrome de Goodpasture, granulomatosis de Wegener y encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). En un caso específico, el ratón comprende un polimorfismo en un FcγR de baja afinidad, y el rasgo se selecciona entre una capacidad mejorada de mediar en la ADCC en comparación con la mayoría de la población humana que no porta el polimorfismo, y una capacidad reducida de mediar en la ADCC en comparación con la mayoría de la población humana que no porta el polimorfismo.

También se desvela un método de creación de un anticuerpo anti-cadena α de FcR humano en un ratón, que comprende la exposición de un ratón de acuerdo con la invención a un FcR humano como se describe en el presente documento. En un caso, se aísla un anticuerpo que reconoce el FcR humano del ratón. En otro caso, se identifica y se clona una secuencia de ácido nucleico que codifica toda o parte de una región variable de un anticuerpo que reconoce el FcR humano.

También se desvela un método para determinar la capacidad de los anticuerpos anti-FcR humano de dirigir moléculas a células que expresan FcR para la fagocitosis de la molécula diana, que comprende exponer un ratón como se describe en el presente documento a un agente que comprende un anticuerpo anti-FcR humano, y medir la fagocitosis de la molécula diana.

También se desvela un método de generación de un anticuerpo, en un ratón, contra un antígeno que sea poco inmunogénico en un ratón que sea de tipo silvestre con respecto a uno o más FcγR, que comprende exponer un ratón como se describe en el presente documento, que carece de un FcR de baja afinidad de ratón, pero que expresa una cadena γ de FcγR contra el antígeno que es poco inmunogénico en el ratón que es de tipo silvestre con respecto a uno o más FcγR, e identificar un anticuerpo que reconozca al antígeno poco antigénico. En un caso, el método comprende aislar el anticuerpo del ratón. En otro caso, se identifica y se clona una secuencia de ácido nucleico que codifica toda o parte de una región variable del anticuerpo.

También se desvela un método de creación de un ratón capaz de generar anticuerpos que comprendan regiones variables humanas, que comprende una etapa de reproducción de un primer ratón como se describe en el presente documento con un segundo ratón que comprende (a) uno o más segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humana y uno o más genes de la región constante humana; o (b) uno o más segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humana unidos operativamente a un gen de la región constante de ratón, en el que los segmentos génicos humanos reemplazan los segmentos génicos de la región variable en el locus del segmento génico de la región variable de ratón.

En un caso, el segundo ratón (a) comprende un transgén que comprende uno o más segmentos génicos de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana y un gen de la región constante de cadena ligera humano, y un transgén que comprende uno o más segmentos génicos de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana y uno o más genes de región constante de cadena pesada humanos. En un caso, el transgén que comprende uno o más segmentos génicos de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana comprende dos o más genes de la región constante de cadena pesada, y es capaz de cambiar de clase. En un caso específico, el ratón comprende un locus de cadena ligera endógena inactivado y/o un locus de cadena pesada endógena inactivado. En un caso específico, el ratón comprende una eliminación de un locus de cadena ligera endógena y/o una eliminación de un locus de cadena pesada endógena.

En un caso, el segundo ratón (b) comprende segmentos génicos de la región variable pesada humana y ligera humana, en los locus de ratón de cadena pesada y ligera, respectivamente.

En un aspecto, se proporciona un método de selección de un anticuerpo antitumoral, que comprende una etapa de determinación de la capacidad de un anticuerpo de mediar en la ADCC, en el que la capacidad del anticuerpo de mediar en la ADCC se ensaya determinando la ADCC mediada por una célula de un ratón como se describe en el presente documento, y el anticuerpo se selecciona si media en la ADCC empleando una célula de un ratón modificado genéticamente como se describe en el presente documento. En una realización específica, se determina la unión del anticuerpo a la célula del ratón modificado genéticamente, y el anticuerpo antitumoral se selecciona por su capacidad de unirse a un FcγR humano en la célula. En una realización específica, el FcγR humano es un FcγR de baja afinidad.

En una realización, el anticuerpo antitumoral se identifica por su capacidad mejorada de mediar en la ADCC a través de una célula del ratón en comparación con la capacidad del anticuerpo antitumoral de mediar en la ADCC a través de una célula de un ratón de tipo silvestre. En una realización específica, el anticuerpo antitumoral se identifica por su capacidad de mediar en la ADCC a través de los linfocitos NK. En una realización específica, los linfocitos NK expresan FcγRIIIA humano.

También se desvela un método de selección de un agente antitumoral, que comprende una etapa de administrar un agente que comprende un Fc humano o un Fc humano modificado a un primer animal no humano, en el que el primer animal no humano está modificado genéticamente de acuerdo con la invención y comprende un tumor humano; una etapa de administrar el agente a un segundo animal no humano que comprende el tumor; y determinar la capacidad del primer animal no humano y del segundo animal no humano de retardar el crecimiento del tumor humano tras la administración del agente, en el que el agente se selecciona como un agente antitumoral si presenta una capacidad mejorada de retardar el crecimiento del tumor humano en el primer animal no humano, pero no en el segundo animal no humano.

En un caso, el primer animal no humano se modifica para comprender una eliminación de una subunidad α de FcR endógena, y se modifica para comprender una subunidad α de FcR humana seleccionada del grupo que consiste en una subunidad α de Fc γ RIIA, una subunidad α de Fc γ RIIB, una subunidad α de Fc γ RIIC, una subunidad α de Fc γ RIIIA, una subunidad α de Fc γ RIIIB y una combinación de las mismas. En un caso, el segundo animal es un animal de tipo silvestre. En un caso, el primer animal no humano expresa una cadena γ y FcR endógena.

En un caso, el primer animal no humano expresa un Fc γ RI endógeno funcional.

También se desvela un método de creación de un ratón que carece de un Fc γ R de ratón de baja afinidad, expresa una cadena γ y de FcR funcional, y comprende genes que codifican cadenas α del Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIA y Fc γ RIIIB humanos, que comprende una etapa de reemplazar las cadenas α de Fc γ R de ratón de baja afinidad por cadenas α de Fc γ R humanas, en el locus de la cadena α de Fc γ R de ratón.

En un caso, una primera etapa comprende la eliminación de las cadenas α de los genes Fc γ RIIB, Fc γ RIV y Fc γ RIII endógenos y la inserción de las cadenas α de los genes Fc γ RIIA y Fc γ RIIIA humanos; una segunda etapa comprende insertar las cadenas α de los genes Fc γ RIIB, Fc γ RIIC y Fc γ RIIIB humanos en el genoma del ratón que resulta de la primera etapa; en el que el ratón comprende un gen de la cadena γ y de FcR de ratón funcional. En un caso específico, las cadenas α de los genes Fc γ RIIB, Fc γ RIIC y Fc γ RIIIB humanos de la segunda etapa se introducen en 5' con respecto a las cadenas α de los genes Fc γ RIIA y Fc γ RIIIA humanos de la primera etapa.

También se desvela un método para determinar la destrucción celular por un agente terapéutico humano en un no primate, que comprende una etapa de exponer una célula, un embrión no humano o un animal no humano a un agente terapéutico humano que comprende un Fc humano, en el que la célula, el embrión o el animal comprende una cadena γ y de FcR funcional y comprende un reemplazo de uno o más genes endógenos de cadena α de Fc γ R de baja afinidad por una o más cadenas α de Fc γ R humanas, y determinar la capacidad del agente terapéutico humano de mediar en la destrucción celular a través de un Fc γ R humano de baja afinidad de la célula, del embrión o del animal.

En un caso, el no primate es un ratón. En una realización específica, los genes de cadena α de Fc γ R de ratón endógenos Fc γ RIIB, Fc γ RIV y Fc γ RIII están reemplazados por genes de cadena α de Fc γ R humanos Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIA y Fc γ RIIIB.

En un caso, la célula se selecciona de entre un linfocito B, un mastocito, un basófilo, un macrófago, un eosinófilo, un neutrófilo, una célula dendrítica, una célula de Langerhans y una combinación de los mismos. En un caso específico, la célula es un linfocito NK, y se determina la ADCC mediada por linfocitos NK por un anticuerpo humano o humanizado. En un caso específico, el Fc γ R humano de baja afinidad es un Fc γ RIIIA humano.

También se desvela un método para determinar la trombosis dependiente del agente terapéutico que comprende exponer un primer animal no humano que exprese un Fc γ RIIA humano en una plaqueta a un agente terapéutico; exponer un segundo animal no humano que no exprese el Fc γ RIIA humano en una plaqueta a dicho agente terapéutico; medir en el primer animal no humano y en el segundo animal no humano una cantidad de trombosis dependiente del agente terapéutico; y determinar una diferencia en la trombosis dependiente del agente terapéutico.

En un caso, el animal no humano se selecciona entre un ratón y una rata.

En un caso, la diferencia determinada en la trombosis dependiente del agente terapéutico se emplea para identificar un riesgo asociado con la administración del agente terapéutico a un ser humano. En un caso, la diferencia determinada produce un cambio de administración del agente terapéutico a un paciente humano que lo necesita.

Descripción detallada

La invención no se limita a métodos y condiciones experimentales particulares descritos, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. La terminología usada en el presente documento solo tiene el fin de describir determinadas realizaciones, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen

el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto familiarizado con la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o en el ensayo de la presente invención, a continuación, se describen métodos y materiales particulares.

5 La expresión "construcción de dirección" incluye una molécula de polinucleótido que comprende una región de dirección. Una región de dirección comprende una secuencia que es esencialmente homóloga a una secuencia de una célula diana, tejido o animal, y proporciona la integración de la construcción de dirección en una posición dentro del genoma de la célula, del tejido o del animal. En una realización específica, la construcción de dirección
10 comprende además una secuencia de ácido nucleico o un gen de particular interés, un marcador seleccionable, secuencias de control y/o reguladoras, y otras secuencias de ácido nucleico que permitan la recombinación mediada a través de la adición exógena de proteínas que ayudan o facilitan la recombinación que en la que participan dichas secuencias. En otra realización específica, la construcción de dirección comprende además un gen de interés, en la que el gen de interés es un gen heterólogo que codifica una proteína que tiene una función similar a la de una
15 proteína codificada por la secuencia endógena.

El término "reemplazo" incluye aquel en el que se coloca una secuencia de ADN en un genoma de una célula de manera que reemplace una secuencia de dentro de un genoma, en el locus de la secuencia genómica, por una secuencia heteróloga (por ejemplo, una secuencia humana en un ratón), a menos que se indique otra cosa. La
20 secuencia de ADN así colocada puede incluir una o más secuencias reguladoras que son parte del ADN fuente usado para obtener la secuencia así colocada (por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones 5' o 3' no traducidas, etc. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el reemplazo es una sustitución de una secuencia heteróloga por una secuencia endógena, que da lugar a la producción de un producto génico a partir de la secuencia de ADN así colocada (que comprende la secuencia heteróloga), pero no la expresión de la secuencia endógena; el
25 reemplazo es de una secuencia genómica endógena por una secuencia de ADN que codifica una proteína que tiene una función similar a una proteína codificada por la secuencia genómica endógena (por ejemplo, la secuencia genómica endógena codifica un receptor FcγR de ratón de baja afinidad, y el fragmento de ADN codifica uno o más receptores de FcγR de baja afinidad humanos, tales como, *por ejemplo*, un FcγRIIC y/o un FcγRIIIB humanos).

El término "FcγR" incluye un receptor para un Fc, *por ejemplo*, una parte Fc de una inmunoglobulina IgG. Los genes FcγR incluyen una cadena α que se expresa en la superficie de la célula y sirve como un dominio de unión al ligando, y se asocia con un homodímero de la cadena γ de FcR o un heterodímero de la cadena γ y la cadena δ de FcR. Existen varios genes diferentes de FcγR, y se pueden clasificar en tipos de baja afinidad y de alta afinidad de acuerdo con la unión preferencial a IgG en complejos inmunes. Los genes FcγR de baja afinidad en los seres
30 humanos incluyen FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA y FcγRIIIB, y, dentro de la mayoría de estos genes, se han descrito diferencias genéticas o polimorfismos naturales en sujetos humanos con enfermedades autoinmunes. Los expertos en la materia, al leer la presente divulgación, reconocerán que es posible reemplazar uno o más genes FcγR endógenos de baja afinidad de un genoma (o de todos) por uno o más genes heterólogos FcγR de baja afinidad (por ejemplo, variantes o polimorfismos tales como formas alélicas, genes de otra especie, formas
40 quiméricas, etc.

La expresión "variantes alélicas" incluye variaciones de una secuencia normal de un gen que dan lugar a una serie de diferentes formas del mismo gen. Las diferentes formas pueden comprender diferencias de hasta, *por ejemplo*, 20 aminoácidos en la secuencia de una proteína de un gen. Por ejemplo, se puede entender que los alelos son
45 secuencias de ADN alternativas en el mismo locus del gen físico, que pueden dar lugar o no a diferentes rasgos (por ejemplo, características fenotípicas heredables) tales como la susceptibilidad a ciertas enfermedades o afecciones que no dan lugar a otros alelos para el mismo gen o que dan lugar a diversos grados en los otros alelos.

Una "célula auxiliar" incluye una célula inmune que participa en las funciones efectoras de la respuesta inmune. Las células inmunes ilustrativas incluyen una célula de origen linfóide o mielóide, *por ejemplo*, linfocitos, linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, plaquetas, células de Langerhans, células dendríticas, mastocitos, etc. Las células auxiliares llevan a cabo funciones específicas del sistema inmune a través de receptores, *por ejemplo*, FcR, expresados en sus superficies. En una realización específica, una célula auxiliar es capaz de generar la ADCC mediada a través de un FcR, *por ejemplo*, un FcγR de
50 baja afinidad, expresado en la superficie celular. Por ejemplo, los macrófagos que expresan FcR participan en la fagocitosis y la destrucción de bacterias recubiertas de anticuerpos. Las células auxiliares también pueden ser capaces de liberar un agente que medie en otros procesos inmunes. Por ejemplo, los mastocitos pueden ser activados por anticuerpos unidos a FcR para liberar gránulos, *por ejemplo*, moléculas inflamatorias (por ejemplo, citocinas) en un sitio de infección. En otras diversas realizaciones, la expresión de los FcR en células auxiliares se
60 puede regular mediante otros factores (por ejemplo, citocinas). Por ejemplo, la expresión de FcγRI y FcγRIII puede ser inducida mediante la estimulación con interferón γ (IFN-γ).

FcR de ratón y humanos

65 Los receptores de las regiones Fc (es decir, constantes) de inmunoglobulinas (FcR) desempeñan un importante papel en la regulación de la respuesta inmune. Los FcR están presentes en las células auxiliares del sistema inmune

del hospedador para eliminar eficazmente los antígenos foráneos unidos por un anticuerpo. Los FcR también desempeñan un papel importante en el equilibrio tanto de la respuesta de activación como de la respuesta de inhibición de las células auxiliares del sistema inmune. Los FcR participan en la fagocitosis por macrófagos, en la desgranulación de los mastocitos, la captación de complejos de anticuerpo-antígeno y la modulación de la respuesta inmune, así como en otros procesos del sistema inmune.

En ratones y en seres humano, diferentes FcR se expresan diferencialmente en la superficie de diferentes células auxiliares, siendo cada una específica de los isotipos de inmunoglobulina presentes en el repertorio de anticuerpos expresados. Por ejemplo, los anticuerpos de inmunoglobulina G (IgG) median en las funciones efectoras a través de los receptores de IgG (FcγR). Los FcγR se han clasificado en tres grupos: FcγRI de activación de alta afinidad (CD64), FcγRII de inhibición de baja afinidad (CD32) y FcγRIII de activación de baja afinidad (CD16). Aunque cada grupo está presente tanto en ratones como en seres humanos, el número de isoformas y subconjuntos de células inmunes en los que están presentes es diferente. Por ejemplo, FcγRIIA y FcγRIIIB se expresan en células auxiliares en seres humanos, pero, según se ha informado, están ausentes en ratones. Además, las afinidades de los diferentes isotipos de IgG (por ejemplo, IgG1) para cada FcγR son diferentes en ratones y en seres humanos.

Se cree que la activación o inhibición de la señalización celular a través de los FcγR y las funciones efectoras asociadas con la unión de anticuerpos a los FcγR están mediadas por motivos de secuencias específicos de dominios intracelulares de FcγR o de las subunidades de correceptores. Los receptores de activación se asocian más comúnmente con la cadena γ común (cadena γ de FcR), que contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM). Los ITAM contienen una secuencia específica de aproximadamente 9-12 aminoácidos, que incluyen restos de tirosina que se fosforilan en respuesta a la unión de anticuerpos a un FcR. La fosforilación conduce a una cascada de transducción de señales. Se ha informado de ratones que carecen de un gen codificante de una cadena γ de FcR (desactivación de la cadena γ de FcR) (por ejemplo, Véase Takai *et al.* (1994) «FcR γ Chain Deletion Results in Pleiotrophic Effector Cell Defects», *Cell* 76:519-529; van Vugt *et al.* (1996) FcR γ-Chain Is Essential for Both Surface Expression and Function of Human FcγRI (CD64) In Vivo, *Blood* 87(9):3593-3599; y Park *et al.* (1998) Resistance of Fc Receptor-deficient Mice to Fatal Glomerulonephritis, *J. Clin. Invest.* 102(6):1229-1238). La cadena γ de FcR es, según se ha informado, esencial para la función y la expresión en la superficie adecuadas (por ejemplo, la transducción de señales, la fagocitosis, etc.) de la mayoría de los FcR; de acuerdo con algunos informes, los ratones con desactivación de la cadena γ de FcR carecen de FcγRI. Sin embargo, otros informes revelan que los ratones con desactivación de la cadena γ de FcR expresan FcγRI en la superficie de ciertas células auxiliares, y el FcγRI expresado parece ser funcional, en tanto en cuanto se une a IgG en ratones en ausencia de la cadena γ de FcR expresada (Barnes *et al.* (2002) «FcγRI-Deficient Mice Show Multiple Alterations to Inflammatory and Immune Responses», *Immunity* 16:379-389).

Por el contrario, FcγRIIB es un receptor inhibitorio que contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático. Como los ITAM, los ITIM son motivos de secuencia que incluyen restos de tirosina fosforilables. Sin embargo, los eventos cadena abajo de la fosforilación de un ITIM conducen a la inhibición, y no a la activación, de las funciones de las células inmunes. Según se ha informado, los ratones deficientes en FcγRIIB muestran una mayor respuesta de anticuerpos en comparación con los ratones de tipo silvestre (Takai *et al.* (1996) «Augmented humoral and anaphylactic responses in FcγRII-deficient mice», *Nature* 379: 346-349), una observación que respalda el papel de FcγRIIB como un regulador a la baja de la respuesta de anticuerpos de linfocitos B.

En seres humanos, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA y FcγRIIIB se consideran los genes FcγR de baja afinidad clásicos, y están situados juntos en el mismo cromosoma (Su *et al.* (2002) «Genomic organization of classical human low-affinity Fcγ receptor genes», *Genes and Immunity* 3 (Supl. 1):S51-S56). Estos genes presentan varios polimorfismos asociados con distintos fenotipos, por ejemplo, una alteración de la unión a ligandos y de la función del receptor. Algunos polimorfismos están asociados con enfermedades autoinmunes, por ejemplo, lupus eritematoso diseminado (LED), artritis reumatoide (AR) y esclerosis múltiple (EM). Se han desarrollado ratones transgénicos para diferentes FcγR humanos (hFcγR) y se han usado como modelos de enfermedades, generando anticuerpos de alta afinidad, ensayando los anticuerpos terapéuticos para determinar la capacidad de generar respuestas celulares específicas, detectando los compuestos que mejoran las respuestas inmunes aberrantes, etc., por ejemplo, Véase Heijnen *et al.* (1996) «A Human FcγRI/CD64 Transgenic Model for In Vivo Analysis of (Bispecific) Antibody Therapeutics», *J. Hematother.* 4:351-356; Heijnen y van de Winkel (1996) «Antigen Targeting to Myeloid-specific Human FcγRI/CD64 Triggers Enhanced Antibody Responses in Transgenic», *J. Clin. Invest.* 97(2):331-338; patentes de EEE.UU. n.º 6.111.166, 6.676.927, 7.351.875, 7.402.728 y 7.416.726).

A pesar de las funciones importantes de los FcR en proporcionar el puente entre los anticuerpos y las células auxiliares del sistema inmune, en la actualidad, no existe ningún sistema modelo en el que se expresen todos los hFcγR de baja afinidad. En diversas realizaciones, se podría usar un ratón en el que se expresaran conjuntamente todos los hFcγR de baja afinidad - incluyendo los ratones que carecen de FcγR de ratón endógenos - para reflejar con exactitud los efectos de un anticuerpo humano terapéutico, incluyendo los efectos mediados por la ADCC. Dicho ratón serviría como una herramienta vital en el diseño, el análisis y la evaluación de anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades humanas tales como, *por ejemplo*, AR, diabetes de tipo I, LED y autoinmunidad, proporcionando un modelo animal capaz de lograr una evaluación más precisa de los procesos inmunológicos en los

seres humanos, en particular, en el contexto del ensayo de anticuerpos terapéuticos humanos. El ratón también será una valiosa fuente de células portadoras de receptores de baja afinidad, células que se pueden usar en ensayos *in vitro* para evaluar la destrucción celular dependiente de agentes terapéuticos para agentes terapéuticos que se unen a los receptores de baja afinidad y, por lo tanto, para la identificación de agentes terapéuticos humanos útiles.

5

Ratones deficientes en genes FcγR de baja afinidad endógenos

Se proporcionan animales no humanos modificados genéticamente que no expresan genes endógenos de FcγR de ratón de baja afinidad, pero que expresan una cadena γ de FcR de ratón endógena. En diversas realizaciones, la cadena γ de FcR se expresa en una distribución (es decir, en tipos de células) y a un nivel en el ratón que es igual o esencialmente igual al de un ratón de tipo silvestre. Los genes endógenos de FcγR de baja afinidad se pueden expresar bien en la superficie de las células inmunes o, de una manera soluble, en la periferia de los animales. Las modificaciones genéticas para crear un animal no humano que no exprese genes endógenos de FcγR de ratón de baja afinidad se describen convenientemente usando el ratón de modo ilustrativo. Un ratón modificado genéticamente de acuerdo con la invención se puede crear de varias formas, cuyas realizaciones particulares se analizan en el presente documento.

En la Figura 1, se proporciona una ilustración esquemática (no a escala) de un locus de gen FcγR de ratón de baja afinidad (parte superior) para mostrar la disposición de los genes FcγR en el locus endógeno. Como se ilustra, los genes FcγR de ratón de baja afinidad FcγRIIB, FcγRIV y FcγRIII se presentan conjuntamente en estrecha proximidad en un cromosoma. Cada uno de estos genes comprende la cadena α o el dominio de unión al ligando responsable de la unión de la parte Fc de una molécula de anticuerpo.

Los ratones modificados genéticamente que carecen de una secuencia de nucleótidos codificante de una cadena α de los genes FcγR de baja afinidad endógenos se pueden crear mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede crear un vector de dirección que elimine los genes de cadena α de FcγR de ratón de baja afinidad con gen marcador seleccionable. La Figura 1 ilustra un genoma de ratón (parte inferior) dirigido por una construcción de dirección que tiene un brazo de homología 5' que contiene la secuencia de cadena arriba del locus endógeno de cadena α de FcγR de baja afinidad, seguido de un casete de selección de fármacos (por ejemplo, gen de resistencia a la neomicina flanqueado por secuencias *loxP*), y un brazo de homología 3' que contiene la secuencia de cadena abajo del locus de cadena α de FcγR endógeno de baja afinidad. Tras la recombinación homóloga en el locus, el locus de la cadena α de FcγR endógeno de baja afinidad se reemplaza por un casete de selección de fármaco (parte inferior de la Figura 1). El locus de gen de cadena α FcγR endógeno de baja afinidad se elimina de este modo dando lugar a una célula o a un animal no humano que no expresa genes de la cadena α de FcγR endógeno de ratón de baja afinidad. El casete de selección de fármacos se puede eliminar opcionalmente mediante la adición posterior de una recombinasa (por ejemplo, mediante tratamiento con Cre).

La modificación genética de un ratón para volver no funcionales uno o varios genes de la cadena α de FcγR endógeno de ratón de baja afinidad, en diversas realizaciones, da lugar a un ratón que presenta defectos en la respuesta inmune, haciendo que el ratón sea útil para la evaluación de las funciones cooperativas, así como individuales, de los genes endógenos de FcγR de ratón de baja afinidad en la función inmune normal y anómala, de los procesos mediados por IgG y de la enfermedad autoinmune. En diversas realizaciones, la modificación de las cadenas α de los genes endógenos de FcγR de ratón de baja afinidad, pero no de la cadena γ de FcR, evita una posible reducción de otros genes FcR endógenos (por ejemplo, FcγRI de alta afinidad) que requieren la cadena γ de FcR para la expresión en la superficie y la función, manteniendo así otras diversas funciones y procesos inmunológicos mediados por procesos dependientes de la cadena γ.

De acuerdo con algunos informes, los ratones deficientes en la cadena γ de FcR carecen de la expresión superficial de FcγRIII y FcγRI. Sin embargo, según se ha informado, se ha detectado FcγRI en la superficie celular de ratones deficientes en la cadena γ de FcR, y se informa que es al menos parcialmente funcional. Por el contrario, los ratones de acuerdo con la presente invención contienen la cadena γ de FcR endógena no modificada, que preserva los patrones de expresión superficial celular natural y las funciones celulares de otros genes FcR que requieren la cadena γ de FcR.

En diversas realizaciones, los ratones de la presente invención presentan la ventaja frente a otros ratones deficientes en el gen FcγR de que las modificaciones genéticas que portan producen el mantenimiento de otros genes necesarios para otras funciones inmunológicas no enteramente dedicadas a los genes FcγR de baja afinidad. Por ejemplo, con una cadena γ de FcR funcional, otras proteínas dependientes de la cadena γ (por ejemplo, FcγRI) podrán asociarse con la cadena γ de FcR y participar en funciones de células efectoras en la respuesta inmune. En diversos ratones modificados genéticamente de acuerdo con la invención, se cree que el mantenimiento de dichas funciones (debido a la presencia de una cadena γ de FcR funcional) mientras se eliminan los genes FcγR endógenos de baja afinidad (una o más subunidades α) permite una dilucidación más exacta de las funciones de los FcR en la autoinmunidad.

Ratones FcγR humanizados de baja afinidad

Se proporcionan animales no humanos modificados genéticamente que expresan genes FcγR humanos de baja afinidad. Los genes FcγR humanos de baja afinidad se pueden expresar bien en la superficie de células auxiliares del sistema inmune del animal o, de una manera soluble, en la periferia de los animales.

La modificación genética, en diversas realizaciones, comprende la eliminación de una cadena α funcional de genes FcγR de ratón de baja afinidad y, en algunas realizaciones, una modificación adicional que comprende un reemplazo por dos o más, por tres o más, por cuatro o más, o por cinco genes de subunidad α de FcγR humano de baja afinidad, de manera que el animal no humano exprese un gen de la cadena γ de FcR funcional de ratón. Por lo tanto, se proporciona un ratón que comprende una modificación genética, en el que la modificación genética comprende un reemplazo de un fragmento genómico del locus de gen FcγR de baja afinidad de ratón endógeno, en el que dicho fragmento genómico comprende los genes de ratón codificantes de subunidades α de FcγRIIB, FcγRIV y FcγRIII, con un fragmento genómico humano que codifica al menos dos genes FcγR humanos de baja afinidad seleccionados entre FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIA y FcγRIIB, y en el que el ratón comprende una cadena γ de FcR funcional. También se describen embriones de ratones modificados genéticamente, células y construcciones de dirección para fabricar los ratones, los embriones de ratón y las células.

Se describen las composiciones y los métodos de creación de un ratón que exprese un gen FcγR humano, incluyendo formas polimórficas o variantes alélicas específicas (por ejemplo, diferencias de un solo aminoácido), incluyendo composiciones y el método de creación de un ratón que expresa dichos genes de un promotor humano y una secuencia reguladora humana. Los métodos incluyen volver selectivamente no funcional un gen FcγR endógeno de ratón de baja afinidad (por ejemplo, mediante la eliminación de su cadena α), y emplear una cadena α de un gen FcγR de humano de baja afinidad en el locus de gen FcγR endógeno de ratón de baja afinidad para expresar un gen de la subunidad α de FcγR humano de baja afinidad en un ratón. La eliminación del gen FcγR de ratón de baja afinidad se realiza mediante la eliminación de uno o más genes de cadena α, pero no de un gen de cadena γ de FcR. El enfoque vuelve selectivamente a los genes endógenos de la cadena α de FcγR de baja afinidad no funcionales, mientras se conserva una cadena γ de FcR endógena funcional.

El enfoque de reemplazo de la cadena α de FcR endógena emplea una interrupción relativamente mínima de la transducción de señales natural mediada por FcγR en el animal, en diversas realizaciones, debido a que la secuencia genómica de las cadenas α de FcγR se reemplaza en un solo fragmento y, por lo tanto, conserva la funcionalidad normal al incluir secuencias reguladoras necesarias. De este modo, en dichas realizaciones, la modificación de cadena α de FcγR no afecta a otros FcR endógenos que dependen de las moléculas funcionales de cadena γ de FcR. Además, en diversas realizaciones, la modificación no afecta al ensamblaje de un complejo receptor funcional que implica una cadena α de FcγR y la cadena γ de FcR endógena, que se cree que es necesaria para la expresión adecuada de algunas cadenas α de FcγR en la superficie celular y para la señalización cadena abajo resultante de un receptor activado. Debido a que no se elimina la cadena γ de FcR, en diversas realizaciones, los ratones que contienen un reemplazo de genes endógenos de cadena α de FcγR por genes de cadena α de FcγR humanos deben ser capaces de procesar las funciones efectoras normales de anticuerpos a través de la unión de la parte Fc de las inmunoglobulinas IgG a las cadenas α de FcγR humanos presentes en la superficie de células auxiliares.

En la Figura 4 (parte superior), se proporciona una ilustración esquemática (no a escala) de un gen FcγR de ratón de baja afinidad endógeno eliminado. Como se ilustra, se introducen los genes FcγR humanos de baja afinidad FcγRIIA y FcγRIIAA en el locus de gen FcγR de ratón de baja afinidad endógeno eliminado mediante una construcción de dirección (vector de dirección de FcγRIIAA-IIA humano) con un fragmento genómico que contiene los genes FcγRIIA y FcγRIIAA humanos de baja afinidad humanos. Cada uno de estos genes comprenden la cadena α o el dominio de unión al ligando de los genes FcγR humanos responsables de la unión de la parte Fc de una molécula de anticuerpo.

Los ratones modificados genéticamente que expresan genes FcγR humanos de baja afinidad en el locus de FcγR de ratón de baja afinidad endógeno se pueden crear mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede crear un vector de dirección que introduzca genes FcγR humanos de baja afinidad (por ejemplo, FcγRIIA y FcγRIIAA) con gen marcador seleccionable. La Figura 4 ilustra un genoma de ratón que comprende una eliminación del locus de FcγR de baja afinidad endógeno (parte superior). Como se ilustra, la construcción de dirección contiene un brazo de homología 5' que contiene la secuencia de cadena arriba del locus de FcγR de ratón de baja afinidad endógeno, seguido de un casete de selección de fármacos (por ejemplo, un gen de resistencia a la higromicina flanqueado por ambos lados por secuencias *loxP*), un fragmento genómico que contiene un gen FcγRIIA humano, un gen HSP76 humano y un gen FcγRIIAA humano, y un brazo de homología 3' que contiene la secuencia de cadena abajo del locus de FcγR de ratón de baja afinidad endógeno. Tras la recombinación homóloga en el locus eliminado, se reemplaza el casete de selección de fármacos por la secuencia contenida en el vector de dirección (parte inferior de la Figura 4). El locus de gen FcγR endógeno de baja afinidad se reemplaza por genes FcγR humanos de baja afinidad, dando lugar a una célula o a un animal que expresa genes FcγR humanos de baja afinidad. El casete de selección de fármacos se puede eliminar opcionalmente mediante la adición posterior de una recombinasa (por ejemplo, mediante tratamiento con Cre).

Para la expresión de hFcγRIIA en plaquetas, la construcción de dirección de vector de dirección de hFcγRIIA-IIA humano comprende una secuencia extendida que incluye, *por ejemplo*, toda o esencialmente toda la región promotora humana unida operativamente al gen hFcγRIIA en un genoma humano. Para evitar la expresión de hFcγRIIA en las plaquetas, la construcción de dirección carece de toda o esencialmente toda la región promotora humana unida operativamente al gen hFcγRIIA en un ser humano.

Se pueden realizar otras modificaciones en el locus quimérico (parte inferior de la Figura 4) usando técnicas similares a las descritas para el reemplazo con dos genes FcγR humanos. La modificación para reemplazar el locus de gen FcγR de baja afinidad endógeno por dos genes FcγR humanos puede proporcionar además un punto de partida para la incorporación de otros genes FcγR humanos de baja afinidad. Por ejemplo, En la Figura 6 (parte superior), se proporciona una ilustración esquemática (no a escala) de un locus de FcγR de baja afinidad endógeno reemplazado por dos genes FcγR de baja afinidad humanos. Como se ilustra, se introducen los genes FcγR humanos de baja afinidad FcγRIIB, FcγRIIC y FcγRIIIB en el locus de gen FcγR de ratón de baja afinidad endógeno modificado mediante otra construcción de dirección (vector de dirección de FcγRIIB-IIIB-IIC humano) con un fragmento genómico que contiene los genes FcγRIIB, FcγRIIC y FcγRIIIB humanos de baja afinidad humanos. Cada uno de estos genes comprenden la cadena α o el dominio de unión al ligando de los genes FcγR humanos responsables de la unión de la parte Fc de una molécula de anticuerpo.

Los ratones modificados genéticamente que expresan cinco genes FcγR humanos de baja afinidad en el locus de FcγR de ratón de baja afinidad endógeno se pueden crear mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede crear un vector de dirección que introduzca genes FcγR humanos de baja afinidad (por ejemplo, FcγRIIB, FcγRIIC y FcγRIIIB) con gen marcador seleccionable. La Figura 6 (parte superior) ilustra un genoma de ratón que comprende un reemplazo del locus de FcγR de baja afinidad endógeno por dos genes FcγR humanos de baja afinidad. Como se ilustra, la construcción de dirección contiene un brazo de homología 5' que contiene la secuencia de cadena arriba del locus de FcγR de ratón de baja afinidad endógeno, seguido de un casete de selección de fármacos (por ejemplo, un gen de resistencia a la neomicina flanqueado por ambos lados por secuencias *loxP*), un fragmento genómico que contiene un gen FcγRIIB humano, un gen FcγRIIIB humano, un gen HSP77 humano, un gen FcγRIIC humano, seguido de una secuencia que contiene el brazo de homología 3' cadena arriba del gen FcγRIIIA humano de baja afinidad presente en el locus endógeno. Tras la recombinación homóloga en el locus modificado, se insertan un gen FcγRIIB, FcγRIIIB y FcγRIIC humanos en 5' con respecto a los genes FcγRIIIA y FcγRIIA humanos presentes previamente en el locus de gen FcγR de baja afinidad endógeno mediante la secuencia contenida en el vector de dirección (parte inferior de la Figura 6). El locus de gen FcγR endógeno de baja afinidad modificado se modifica así además para que lleve incorporados tres genes FcγR humanos de baja afinidad adicionales, dando lugar a una célula o a un animal que expresa cinco genes FcγR humanos de baja afinidad. El casete de selección de fármacos se puede eliminar opcionalmente mediante la adición posterior de una recombinasa (por ejemplo, mediante tratamiento con Cre). La Figura 6 (parte inferior) muestra la estructura del locus resultante, que expresará cinco genes FcγR humanos de baja afinidad que pueden detectarse en la superficie de células auxiliares del sistema inmune del animal y asociarse independientemente, según sea apropiado, con una cadena y de FcR endógena.

Modelos experimentales de ratones deficientes en FcγR y ratones FcγR humanizados

Los ratones modificados genéticamente que no expresan genes endógenos de FcγR de ratón de baja afinidad son útiles, *por ejemplo*, para dilucidar las diversas funciones de los genes FcγR de baja afinidad individuales, con el fin de medir la eficacia de un anticuerpo terapéutico humano a través de la inmunidad mediada por células (por ejemplo, la ADCC), para determinar el papel de un FcγR en enfermedades o trastornos inmunes, y servir como modelos de enfermedades o trastornos inmunes, para generar anticuerpos contra una o más proteínas FcγR, y para servir como parejas de reproducción con el fin de generar otros ratones modificados genéticamente de interés.

En un caso, un ratón de acuerdo con la invención se puede usar para determinar un efecto citotóxico perdido (en comparación con un ratón de tipo silvestre) por un ratón que no expresa genes FcγR de baja afinidad mediante la administración de un agente a dicho ratón, en el que se sabe que el agente desencadena un efecto citotóxico dependiente de FcγR en ratones de tipo silvestre. En un caso, se implantan, en un ratón de la presente invención, células tumorales y, Tras un periodo de tiempo posterior, se les inyecta un anticuerpo específico de un antígeno expresado en la superficie de las células tumorales. El isotipo del anticuerpo se conoce antes de la inyección, y los animales se analizan para detectar el deterioro de la ADCC dependiente de FcγR en comparación con la ADCC observada en los animales de tipo silvestre.

En otro caso, los ratones deficientes en receptores endógenos de baja afinidad podrían combinarse (por ejemplo, mediante reproducción) con otros ratones inmunodeficientes para desarrollar *in vivo* modelos de enfermedad autoinmune. Por ejemplo, los ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) se usan rutinariamente en la técnica como organismos modelo para estudiar el sistema inmune. Los ratones SCID tienen una capacidad insuficiente de generar linfocitos T o B, o de activar algunos componentes del sistema del complemento, y no pueden combatir las infecciones de manera eficaz, rechazar tumores y rechazar trasplantes. Los ratones deficientes en el gen de la subunidad α de FcγR de baja afinidad de la presente invención se pueden reproducir con ratones SCID para determinar el agotamiento celular en un animal hospedador en respuesta a la administración de un

anticuerpo terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo antitumoral), lo que determinaría las funciones de ADCC y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) en el agotamiento de las células tumorales *in vivo*.

5 Se proporcionan ratones modificados genéticamente que comprenden un reemplazo de los genes FcγR endógenos de baja afinidad por genes FcγR humanos de baja afinidad. Dichos animales son útiles para estudiar la farmacocinética de anticuerpos completamente humanos y la ADCC mediada por hFcγR. Además, se ha demostrado que los genes FcγR humanos presentan polimorfismos o variantes alélicas asociadas con la enfermedad (por ejemplo, SLE, AR, Granulomatosis de Wegener, síndrome de Guillain-Barré y esclerosis múltiple). De este modo, los animales no humanos modificados genéticamente que comprenden un reemplazo de los genes

10 FcγR endógenos de baja afinidad por formas alélicas o polimórficas específicas de genes FcγR humanos se pueden usar para estudiar enfermedades autoinmunes humanas y rasgos asociados con los polimorfismos, en el animal. En una realización específica, las formas alélicas de los genes FcγR humanos están asociadas con una eficacia potenciada para la IgG humana.

15 En otro caso específico, se determina el efecto de un polimorfismo de FcγR de baja afinidad humano sobre la eficacia de un anticuerpo terapéutico humano. En un caso específico, se administra un anticuerpo antitumoral a un primer ratón humanizado que comprende un primer polimorfismo de un FcγR humano y también a un segundo ratón humanizado que comprende un segundo polimorfismo de un FcγR humano, en el que el primer y el segundo ratón comprenden cada uno una célula tumoral humana; y se evalúa la actividad antitumoral del anticuerpo antitumoral en

20 el primer ratón y en el segundo ratón. En un caso específico, un médico selecciona una opción de tratamiento con respecto al tratamiento de un ser humano que tiene el primer o el segundo polimorfismo, y que tiene un tumor correspondiente a la célula tumoral humana, basándose en la evaluación de la eficacia del anticuerpo antitumoral en el primer ratón y en el segundo ratón.

25 Los polimorfismos adecuados de genes FcγR humanos incluyen todos los conocidos en la técnica. Para el gen FcγRIIA humano, los polimorfismos incluyen, *por ejemplo*, el fenotipo de respuesta alta y de respuesta baja informado por la capacidad de los linfocitos T para proliferar en respuesta a IgG. El polimorfismo de respuesta alta se caracteriza por un resto de arginina en la posición 131 (131Arg), mientras que el de respuesta baja se caracteriza por un resto de histidina en la posición 131 (131 His). En una realización específica, la secuencia de FcγRIIA humana comprende el polimorfismo de 131 His. En SEQ ID NO: 32, se muestra una secuencia de proteína

30 representativa de la cadena α de FcγRIIA humana.

Las sustituciones de un solo nucleótido del gen FcγRIIB humano dan lugar a sustituciones de sentido erróneo en el dominio de unión al ligando (cadena α), y afectan putativamente a la capacidad de unión de una parte Fc de una IgG para unirse a la cadena α de FcγRIIB en la superficie celular. Por ejemplo, se ha demostrado que la sustitución de una isoleucina con un resto de treonina en la posición 232 (Ile232Thr) dentro del dominio transmembrana del gen FcγRIIB en ratones afecta a la capacidad de señalización del receptor. En una realización específica, el gen FcγRIIB humano comprende la variante de isoleucina (232Ile). En SEQ ID NO:33, se muestra una secuencia de proteína

35 representativa de la cadena α de FcγRIIB humana.

40 Se propone que las variantes alélicas del gen FcγRIIIA humano participan en la susceptibilidad al LED y a la AR. Esta variante alélica incluye una sustitución de valina por fenilalanina en la posición 158 (Val158Phe). La variante alélica de valina (158Val) se caracteriza por tener una mayor afinidad por IgG1 e IgG3 que la variante alélica de fenilalanina (158Phe). Se ha propuesto que la variante alélica 158Phe conduce a una eliminación reducida de los complejos inmunes. En una realización específica, el gen FcγRIIIA humano comprende la variante alélica 158Val. En SEQ ID NO: 35, se muestra una secuencia de proteína representativa de la cadena α de FcγRIIIA humana.

45

Las variantes alélicas del gen FcγRIIB humano incluyen los alelos del antígeno de neutrófilos 1 (NA1) y del antígeno de neutrófilos 2 (NA2). Se ha propuesto que estas variantes alélicas participan en reacciones de transfusión de sangre, neutropenia aloinmune, LED y granulomatosis de Wegener. La variante alélica NA2 se caracteriza por una capacidad disminuida para mediar en la fagocitosis. En una realización específica, el gen FcγRIIB humano comprende la variante alélica NA2. En SEQ ID NO: 36, se muestra una secuencia de proteína representativa de la cadena α de FcγRIIB humana.

50

55 En un aspecto, los ratones modificados genéticamente son útiles para optimizar funciones mediadas por FcγR desencadenadas por la parte Fc de anticuerpos terapéuticos. Las regiones Fc de los anticuerpos se pueden modificar mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se pueden modificar los restos de aminoácidos de dentro de la parte Fc (por ejemplo, los dominios CH2 y CH3) para potenciar selectivamente la afinidad de unión a FcγRIIIA humano. De este modo, el anticuerpo resultante debería tener una ADCC dependiente de FcγRIIIA potenciada. En una realización específica, se usa un ratón que expresa FcγRIIIA humano de la presente invención para evaluar la capacidad de ADCC potenciada de un anticuerpo humano modificado administrando un anticuerpo humano modificado al ratón, detectando (por ejemplo, *in vitro*) la unión del anticuerpo a células que expresan FcγRIIIA y comparando la actividad de ADCC observada con la actividad de ADCC observada según lo determinado en un animal de tipo silvestre.

60

65

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de ratones deficientes en genes FcγR de baja afinidad

- 5 Se construyó una construcción de dirección para la introducción de una eliminación del locus de FcγR de ratón de baja afinidad endógeno (descrito a continuación) (Figura 1).

La construcción de la dirección se preparó usando la tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.586.251 y Valenzuela *et al.* (2003) «High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis», *Nature Biotech.* 21(6):652-659) para modificar el cromosoma artificial bacteriano (BAC) RP23-395f6 (Invitrogen). Se modificó el ADN del BAC RP23-395f6 para eliminar los genes FcγRIIB, FcγRIV y FcγRIII endógenos de baja afinidad que comprenden la cadena α de cada uno de los FcγR.

- 10 En resumen, se crearon brazos de homología cadena arriba y cadena abajo empleando los cebadores mFcR 5-up-1 (5'-ACCAGGATAT GACCTGTAGA G; SEQ ID NO: 1) y mFcR 3-up-1a (GTCCATGGGT AAGTAGAAAC A; SEQ ID NO: 2), y mFcR 5-DN (ATGCGAGCTC ATGCATCTATG TCGGGTGCGG AGAAAGAGGT AATGCATTCTTGCCCAATAC TTAC; SEQ ID NO:3) y mFcR 3-DN (ACTCATGGAG CCTCAACAGG A; SEQ ID NO: 4), respectivamente. Se usaron estos brazos de homología para crear un casete que eliminara las cadenas α de los genes FcγRIIB, FcγRIV y FcγRIII endógenos de baja afinidad. La construcción de dirección incluía un gen de resistencia a la neomicina flanqueado por lox, que comprendía brazos de homología que comprendían una secuencia homóloga a una región 5' y una región 3' con respecto al locus endógeno. Los genes y/o las secuencias
- 20 cadena arriba del gen FcγRIIB endógeno y cadena abajo del gen FcγRIII endógeno (véase la Figura 1) no se modificaron mediante la construcción de dirección.

- 25 La eliminación dirigida se confirmó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando cebadores fuera de la región eliminada y dentro de la construcción de dirección. La región de cadena arriba del locus eliminado se confirmó mediante PCR usando cebadores mFcR-up-detect (ATCCTGAGTA TACTATGACA AGA; SEQ ID NO: 5) y PGK-up-detect (ACTAGTGAGA CGTGCTACTT C; SEQ ID NO: 6), mientras que la región de cadena abajo del locus eliminado se confirmó usando los cebadores pA-DN-detect (CTCCCACTCA TGATCTATAG A; SEQ ID NO: 7) y mFcR-DN-detect (TGGAGCCTCA ACAGGACTCC A; SEQ ID NO: 8). La secuencia de nucleótidos a través del punto de eliminación cadena arriba incluía lo siguiente, que indica la secuencia de ratón endógena cadena abajo del gen FcγRIIB (contenida entre paréntesis a continuación) unida contiguamente a la secuencia de casete presente en el punto de eliminación: (GTCCATGGGT AAGTAGAAAC A)TTGCTACC TTAGGACCGT TA (SEQ ID NO: 9). La secuencia de nucleótidos a través del punto de eliminación cadena abajo incluía lo siguiente, que indica la secuencia de casete contigua con la secuencia de ratón endógena cadena arriba del gen FcγRIII (contenida entre paréntesis a continuación): CGGGTGCGGA GAAAGAGGTA AT(GCATTCTT GCCCAACTACT TA) (SEQ ID NO: 10).

- 35 Se generaron ratones deficientes en FcγRIIB, FcγRIII y FcγRIV a través de la electroporación de un ADN de BAC diana (descrito anteriormente) en células ES de ratón. Los clones de células ES positivas se confirman mediante exploración con Taqman™ y cariotipado. A continuación, se usaron clones de células ES positivas para implantarlos en ratones hembra, dando lugar a una camada de crías deficientes en genes FcγR de baja afinidad.

Ejemplo 2: Caracterización de ratones deficientes en genes FcγR de baja afinidad

- 45 Se recogieron bazo de ratones deficientes en FcγR y de tipo silvestre, y se perfundieron 10 ml de colagenasa-D en bolsas desechables estériles. A continuación, se dispuso cada bolsa que contenía un solo bazo en un Stomacher® (Seward) y se homogeneizó en un ajuste medio durante 30 segundos. Se transfirieron los bazos homogeneizados a placas Petri de 10 cm y se incubaron durante 25 minutos a 37 °C. Se separaron las células con una pipeta usando una dilución 1:50 de EDTA 0,5 M, seguido de otra incubación durante cinco minutos a 37 °C. Se sedimentaron las células con una centrifuga (1000 rpm durante 10 minutos) y se sometieron a lisis los glóbulos rojos en 4 ml de tampón ACK (Invitrogen) durante tres minutos. Los esplenocitos se diluyeron con RPMI-1640 (Sigma) y se centrifugaron de nuevo. Se volvieron a suspender las células granuladas en 10 ml de RPMI-1640, y se filtraron con un filtro de células de 0,2 μm.

- 55 **Citometría de flujo.** Se identificaron las poblaciones de linfocitos mediante FAC en el sistema BD LSR II (BD Bioscience) con los siguientes marcadores de superficie celular conjugados con fluorocromo: anti-CD19 (linfocitos B), anti-CD3 (linfocitos T), anti-NKp46 (linfocitos NK) y anti-F4/80 (macrófagos). Se seleccionaron linfocitos para linajes celulares específicos y se analizaron para determinar la expresión de FcγRIII y FcγRIIB endógenos con un anticuerpo de rata anti-FcγRIII/II de ratón (clon 2.4G2, BD Biosciences). El clon 2.4G2 reconoce un epítipo polimórfico común en los dominios extracelulares de FcγRIII y FcγRII murinos. Los resultados muestran que no
- 60 había FcγRIII ni FcγRII murinos de baja afinidad detectables en los linfocitos B, linfocitos NK y macrófagos en ratones FcγR KO (Figura 2).

- Ensayo de ADCC** Se analizaron esplenocitos aislados de ratones deficientes en genes FcγR y de tipo silvestre para determinar su capacidad de realizar la ADCC en un ensayo de destrucción celular. Se aislaron poblaciones celulares y se separaron usando tecnología MACS® (Miltenyi Biotec). En resumen, se empobrecieron los esplenocitos de

linfocitos T usando perlas anti-CD3 de ratón marcadas magnéticamente. Los esplenocitos empobrecidos en linfocitos T se enriquecieron luego en linfocitos NK usando perlas anti-CD49B de ratón marcadas magnéticamente. Por separado, se recubrieron células Raji (que expresan CD20 humana) con concentraciones variables (que varían de 0,1 a 10 µg/ml) de anticuerpo anti-CD20 humana de ratón (Clon B1; Beckman Coulter) durante 30 minutos a 4 °C.

Se incubaron las células Raji recubiertas con anticuerpo con los linfocitos NK enriquecidos en proporciones (NK:Raji) de 100:1 y 50:1 durante cuatro horas a 37 °C. Se midió la muerte celular usando el ensayo de citotoxicidad CytoTox-Glo™ (Promega). La señal de luminiscencia se deriva de células lisadas y es proporcional a la cantidad de células muertas. Se determinó la luminiscencia de los controles (sin anticuerpo anti-CD20) para el recuento de células muertas de fondo para cada proporción, y se restaron de las mediciones para los ratones de tipo silvestre y KO. Se calculó la muerte celular media y se determinó el porcentaje de reducción en la muerte celular (% de ADCC) en comparación con el tipo silvestre. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

	mFcγR KO	% de ADCC		
		10 µg/ml de anticuerpo B1	1 µg/ml de anticuerpo B1	0,1 µg/ml de anticuerpo B1
linfocitos NK:células Raji	100:1	42	53	35
	50:1	15	0	0

Ejemplo 3: Empobrecimiento *in vivo* de linfocitos B en ratones deficientes en genes FcγR de baja afinidad

Se determinó el efecto de los isotipos de Fc humano o murino en el empobrecimiento de linfocitos B a través de la vía ADCC para diversos compartimentos de linfocitos B en ratones deficientes en genes FcγR de baja afinidad diseñados mediante ingeniería genética para expresar CD20 humana usando un anticuerpo humano anti-CD20 humana. Se diseñaron mediante ingeniería genética por separado ratones que expresaban CD20 humana usando técnicas conocidas en la materia. Se prepararon ratones que expresaban CD20 humana en linfocitos B y que eran deficientes en genes FcγR de baja afinidad (descritos en el Ejemplo 1) mediante técnicas de reproducción convencionales de las dos cepas de ingeniería genética.

Se administraron a cada uno de varios grupos separados de ratones que expresaban CD20 humana y que tenían un complemento completo de genes FcγR de baja afinidad endógenos uno de los siguientes: (1) 10 mg/kg de anticuerpo de control (N = 4; anticuerpo humano no específico de CD20 humana que tiene una IgG2a de ratón); (2) 2 mg/kg de Ab 168 (N = 3; anticuerpo humano anti-hCD20 con una IgG2a de ratón; secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera encontradas en SEQ ID NO: 339 y 347, respectivamente, de la publicación de patente de EE.UU. n.º 2009/0035322); (3) 10 mg/kg de Ab 168; (4) 2 mg/kg de Ab 735 (N = 3; Ab 168 con IgG1 humana); (5) 10 mg/kg de Ab 735. En un conjunto similar de experimentos, los grupos de ratones que expresaron CD20 humana y tenían una eliminación de los genes FcγR de baja afinidad endógenos recibieron los anticuerpos de control y anti-hCD20 humanos (descritos anteriormente).

A los ratones de cada grupo se les administraron los anticuerpos mediante inyecciones intraperitoneales. Siete días después de la inyección, se sacrificaron los animales y se identificó el contenido de linfocitos B restante de la médula ósea (B220⁺/IgM⁺), la sangre periférica (B220⁺/CD19⁺), el ganglio linfático, (B220⁺/CD19⁺) y el bazo (B220⁺/CD19⁺) mediante FACS multicolor realizada en un citómetro de flujo LSR-II, y se analizó usando el programa informático Flow-Jo (según lo descrito anteriormente). Los resultados de los experimentos de empobrecimiento de linfocitos B se muestran en las Figuras 3A-3D.

Como se muestra en las Figuras 3A-3D, Ab 735 agotó los linfocitos B con una eficacia inferior a la de Ab 168 en ratones que contenían un complemento completo de genes FcγR de baja afinidad. Además, para ambos anticuerpos (Fc de ratón y humana), el empobrecimiento de linfocitos B se redujo significativamente en los ratones que carecían de un complemento completo de genes FcγR de baja afinidad. Este ejemplo muestra que la capacidad de empobrecimiento de los linfocitos B a través de la vía de ADCC requiere FcγR de baja afinidad, y demuestra que la medición de la eficacia de ADCC para los anticuerpos que contienen regiones constantes humanas en ratones es más adecuada mediante el uso de ratones modificados genéticamente que contienen un complemento completo genes FcγR de baja afinidad.

Ejemplo 4: Generación de ratones FcγRIIA/FcγRIIA humanizados

Se construyó una construcción de dirección para la introducción de dos genes FcγR humanos de baja afinidad en un locus de FcγR de ratón de baja afinidad endógeno eliminado (descrito a continuación) (Figura 4).

Se fabricó una construcción de dirección que comprendía genes FcγRIIA y FcγRIIAA humanos usando métodos similares (véase el Ejemplo 1) a través de la modificación de BAC RP23-395f6 y CTD-2514j12 (Invitrogen). Se modificó el ADN de BAC de ambos BAC para introducir una eliminación de las cadenas α de los genes FcγRIIA y FcγRIIAA humanos de baja afinidad en el locus de FcγR de baja afinidad endógeno eliminado.

De una forma similar, se crearon brazos de homología cadena arriba y cadena abajo empleando los cebadores h14 (GCCAGCCACA AAGGAGATAA TC; SEQ ID NO: 11) y h15 (GCAACATTTA GGACAACTCG GG; SEQ ID NO:12), y h4 (GATTTCTTAA CCACCTACCC C; SEQ ID NO:13) y h5 (TCTTTTCCAA TGGCAGTTG; SEQ ID NO: 14), respectivamente. Estos brazos de homología se usaron para crear un casete que introdujo las cadenas α de los genes Fc γ RIIA y Fc γ RIIAA humanos de baja afinidad en el locus de Fc γ R de baja afinidad de ratón endógeno. La construcción de dirección incluía un brazo de homología 5', que incluía la secuencia 5' hasta el locus de Fc γ R de baja afinidad endógeno eliminado, un gen de resistencia a higromicina FRT'ed, seguido de un fragmento genómico humano de BAC CTD-2514j12, que comprendía los genes de cadena α Fc γ RIIA y Fc γ RIIAA de baja afinidad humanos, y un brazo de homología 3' que comprendía la secuencia de ratón 3' hasta el locus de Fc γ R endógeno de baja afinidad eliminado (centro de la Figura 4). Para un ratón con expresión de Fc γ RIIA en plaquetas de ratón, se construyó una construcción de dirección de manera similar (usando los mismos BAC), excepto que la construcción comprendía una secuencia promotora extendida unida operativamente al gen Fc γ RIIA humano en el genoma humano, por ejemplo, hasta aproximadamente 18 kb o más, usando un casete de higromicina flanqueado en ambos lados por sitios lox2372, en la que la unión de la región promotora y el primer sitio lox 2372 es ATCGGGGATA GAGATGTTTG (CC)GCGATCGC GGTACCGGGC (SEQ ID NO: 37, unión de humana/lox2372 entre paréntesis) y en la que la unión del segundo sitio lox2372 y la secuencia de ratón es TTATACGAAG TTATACCGG(T G)CATTCTTGC CCAATACTTA (SEQ ID NO: 38 unión de lox2372/ratón entre paréntesis). Se usaron cebadores adecuados para genotipar la humanización que comprendía la región promotora.

La inserción diana de los genes de cadena α Fc γ RIIA y Fc γ RIIAA se confirmó mediante PCR (como se ha descrito anteriormente). La región de cadena arriba del locus parcialmente humanizado se confirmó mediante PCR usando cebadores h16 (CCAGGTAAG TCGTGATGAA ACAG; SEQ ID NO: 15) y pA-DN-detect (CTCCCACTCA TGATCTATAG A; SEQ ID NO: 16), mientras que la región de cadena abajo del locus parcialmente humanizado se confirmó usando los cebadores mFcR DN-detect-9 (TGGAGCCTCA ACAGGACTCC A; SEQ ID NO: 17) y h6 (CACACATCTC CTGGTGA CT T G; SEQ ID NO: 18). La secuencia de nucleótidos a través de la unión cadena abajo incluía lo siguiente, que indica un nuevo punto de inserción de la secuencia humana endógena cadena arriba del gen hFc γ RIIA (contenido entre paréntesis a continuación) contigua a la secuencia de ratón endógena 3' del locus de Fc γ R de baja afinidad eliminado: (CAACTGCCAT TGGAAAAGA)C TCGAGTGCCA TTTCATTACC TC (SEQ ID NO: 19). La unión cadena arriba incluye dos secuencias nuevas. Un punto de la unión cadena arriba incluye lo siguiente, que indica la secuencia de nucleótidos del casete de higromicina contigua a la secuencia genómica humana (contenida entre paréntesis a continuación), que comprende la región cadena arriba del gen hFc γ RIIAA introducido: TAAACCCGCG GTGGAGCTC(G CCAGCCACAA AGGAGATAAT CA) (SEQ ID NO: 20). El segundo punto de la unión cadena arriba incluye lo siguiente, que indica una secuencia de nucleótidos de una secuencia endógena de ratón (contenida entre paréntesis a continuación) de la región cadena arriba del locus de Fc γ R de baja afinidad eliminado contigua a una secuencia de nucleótidos dentro del casete de higromicina: (CCATGGGTAA GTAGAAAC)TC TAGACCCCCG GGCTCGATAA CT (SEQ ID NO: 21).

Se generaron ratones que contenían dos genes Fc γ R humanos de baja afinidad (hFc γ RIIA, que carecía de la región promotora extendida, y hFc γ RIIAA) en lugar del locus de Fc γ R de ratón de baja afinidad endógeno mediante la electroporación del ADN de BAC diana (descrito anteriormente) en células ES de ratón. Los clones de células ES positivas se confirmaron mediante exploración con Taqman™ y cariotipado. A continuación, se usaron los clones de células ES positivas para implantarlos en ratones hembra usando el método VELOCIMOUSE® (descrito a continuación) para generar una camada de crías que contuviera un reemplazo de los genes Fc γ R de baja afinidad endógenos con los dos genes Fc γ R de baja afinidad humanos.

Las células ES diana descritas anteriormente se usaron como células ES donantes, y se introdujeron en un embrión de ratón en fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 7.294.754 y Poueymirou *et al.* (2007) «F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor generated ES cells allowing immediate phenotypic analyses», *Nature Biotech.* 25(1):91-99. Se identificaron VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ES donante) portadores de hFc γ RIIA y hFc γ RIIAA mediante genotipado usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela *et al.*, *Supra*), que detectó la presencia de genes de hFc γ R.

Los ratones portadores de genes de hFc γ R pueden reproducirse con una cepa de ratón eliminador de Cre (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2009/114400) con el fin de eliminar cualquier casete neo flanqueado por lox introducido por la construcción de dirección que no sea eliminado, *por ejemplo*, en la etapa de células ES o en el embrión. Opcionalmente, se conserva el casete de neomicina en los ratones.

Se genotipan las crías y se selecciona una cría heterocigota para los genes de hFc γ R para la caracterización de las humanizaciones de Fc γ RIIA y Fc γ RIIAA.

Ejemplo 5: Caracterización de ratones Fc γ RIIAA/Fc γ RIIA humanizados

Se recogieron bazo de ratones Fc γ RIIAA/Fc γ RIIA humanizados (heterocigotos, carentes de la región promotora extendida de Fc γ RIIA) y ratones de tipo silvestre, y se prepararon para FACS (como se ha descrito anteriormente).

Citometría de flujo. Se seleccionaron linfocitos para linajes celulares específicos y se analizaron para determinar la expresión de hFcγRII y hFcγRIII usando un anticuerpo de ratón anti-FcγRII humano (clon FLI8.26; BD Biosciences) y un anticuerpo de ratón anti-FcγRIII humano (Clon 3G8; BD Biosciences), respectivamente. En la Tabla 2, se muestra la expresión relativa (++, +) o la ausencia de expresión (-) observadas para cada subpoblación de linfocitos.

5

Tabla 2

Linaje de linfocitos	hFcγRIII	hFcγRII
Linfocitos B	-	-
Linfocitos NK	++	-
Macrófagos	+	+
Neutrófilos	-	+

En un experimento similar, Se recogieron bazos de ratones FcγRIIIA/FcγRIIA humanizados (homocigotos, carentes de la región promotora extendida de FcγRIIA) y ratones de tipo silvestre, y se prepararon para FACS (como se ha descrito anteriormente). Los resultados se muestran en las Figuras 5A y 5B. El porcentaje de poblaciones de células de linfocitos separadas que expresan FcγRIIIA humano, FcγRIIA humano, o ambos, en ratones homocigotos para FcγRIIIA/FcγRIIA se muestra en la Tabla 3.

10

Tabla 3

Linaje de linfocitos	hFcγRIII	hFcγRII	hFcγRII/hFcγRIII
Linfocitos NK	97	-	-
Macrófagos	26	14	39
Neutrófilos	-	94	-

15

Como se muestra en el presente ejemplo, los ratones modificados genéticamente (genotipos tanto heterocigoto como homocigoto) generados de conformidad con el Ejemplo 3 expresaron el FcγRIIIA humano en los linfocitos NK y macrófagos; y FcγRIIA humano en los neutrófilos y macrófagos, pero no en las plaquetas. El FcγRIIIA humano se expresó a un alto nivel en los linfocitos NK. El patrón de expresión de los genes FcγR humanos que se muestra en el presente ejemplo coincide con los patrones de expresión de estos genes en células auxiliares humanas.

20

Ejemplo 6: Generación de ratones FcγR humanizados de baja afinidad

Se construyó una construcción de dirección para la introducción de tres genes FcγR humanos de baja afinidad adicionales en un locus de FcγR endógeno humanizado de baja afinidad (descrito a continuación) (Figura 6).

25

Se preparó una construcción de dirección que comprendía genes FcγRIIB, FcγRIIIB y FcγRIIC humanos usando métodos similares (véase el Ejemplo 1) a través de la modificación del BAC RP-23 395f6 y RP-11 697e5 (Invitrogen). Se modificó el ADN de BAC de ambos BAC para introducir las cadenas α de los genes FcγRIIB, FcγRIIIB y FcγRIIC humanos de baja afinidad en el locus de FcγR endógeno de baja afinidad parcialmente humanizado que contenía dos genes FcγR de baja afinidad humanos.

30

De forma similar, se crearon brazos de homología cadena arriba y cadena abajo, empleando los cebadores mFcR up-1 (ACCAGGATAT GACCTGTAGA G; SEQ ID NO: 22) y mFcR2b NheI-2 (GTTTCTACTT ACCCATGGAC; SEQ ID NO: 23), y h10 (AAATACACAC TGCCACAGAC AG; SEQ ID NO: 24) y h11 (CCTCTTTTGT GAGTTTCCTG TG; SEQ ID NO: 25), respectivamente. Se usaron estos brazos de homología para crear un casete que introdujera secuencias de ADN codificantes de las cadenas α de FcγRIIB, FcγRIIIB y FcγRIIC humanos de baja afinidad. La construcción de dirección incluía un brazo de homología 5', que incluía la secuencia 5' de ratón hasta el locus de FcγR de baja afinidad endógeno eliminado, un gen de resistencia a la neomicina flanqueado por sitios lox, seguido de un fragmento genómico humano de BAC RP-11 697e5 que comprende genes de cadena α FcγRIIB, FcγRIIIB y FcγRIIC humanos de baja afinidad, y un brazo de homología 3' que comprende la secuencia humana 5' hasta el gen de cadena α FcγRIIIA humano de baja afinidad (en el medio de la Figura 6).

40

La inserción diana de tres genes adicionales de FcγR humanos de baja afinidad se confirmó mediante PCR (como se ha descrito anteriormente). La región de cadena arriba del locus completamente humanizado se confirmó mediante PCR usando cebadores mFcR up-detect-3 (GAGTATACTA TGACAAGAGC ATC; SEQ ID NO: 26) y PGK up-detect (ACTAGTGAGA CGTGCTACTT C; SEQ ID NO: 27), mientras que la región de cadena abajo del locus completamente humanizado se confirmó usando los cebadores neo detect (CTCCCACTCA TGATCTATAG A; SEQ ID NO: 28) y h12 (CTTTTATGG TCCCAACAATC AG; SEQ ID NO: 29). La secuencia de nucleótidos a través de la unión cadena abajo incluía la misma secuencia de genoma humano cadena arriba del gen de la cadena α hFcγRIIA

45

50

(véase el Ejemplo 3; SEQ ID NO: 19). La secuencia de nucleótidos a través de la unión cadena arriba incluía lo siguiente, que indica dos nuevas uniones de secuencias de ratón y de casete, y secuencias genómicas de casete y humana en el punto de inserción. La unión de la secuencia de ratón genómica (contenida entre paréntesis a continuación) y la región cadena arriba de la secuencia de casetes neo es: (GTCCATGGGT AAGTAGAAAC A)TTCGCTACC TTAGGACCGT TA (SEQ ID NO: 30). La segunda unión nueva incluye la unión del extremo 3' del casete neo (contenida entre paréntesis a continuación) y una secuencia genómica humana cadena abajo del gen de la cadena α hFc γ RIIB: (GCTTATCGAT ACCGTGCGAC)A AATACACACT GCCACAGACA GG; SEQ ID NO: 31). Estas uniones se muestran en la Figura 6 (centro) dentro de la construcción de dirección. El genoma modificado resultante del locus de Fc γ R de baja afinidad completamente humanizado se muestra en la Figura 6 (parte inferior).

Se generaron ratones que contenían cinco genes Fc γ R humanos de baja afinidad en lugar del locus de Fc γ R de ratón de baja afinidad endógeno mediante la electroporación del ADN de BAC diana (descrito anteriormente) en células ES de ratón. Los clones de células ES positivas se confirmaron mediante exploración con Taqman™ y cariotipado. A continuación, se usaron los clones de células ES positivas para implantarlos en ratones hembra (como se ha descrito anteriormente) para generar una camada de crías que contuviera un reemplazo de los genes Fc γ R de baja afinidad endógenos por cinco genes Fc γ R de baja afinidad humanos.

Ejemplo 7: Caracterización de ratones Fc γ R humanizados de baja afinidad

Se recogieron bazo de ratones Fc γ R completamente humanizados (heterocigotos) y ratones de tipo silvestre, y se prepararon para FACS (como se ha descrito anteriormente).

Citometría de flujo. Se seleccionaron linfocitos para linajes celulares específicos y se analizaron para determinar la expresión de Fc γ RIIA y Fc γ RIIA usando un anticuerpo de ratón anti-Fc γ RII humano (clon FL18.26; BD Biosciences) y un anticuerpo de ratón anti-Fc γ RIII humano (Clon 3G8; BD Biosciences), respectivamente. En la Tabla 4, se muestra la expresión relativa (++, +) o la ausencia de expresión (-) observadas para cada subpoblación de linfocitos.

Tabla 4

Linaje de linfocitos	hFc γ RIII	hFc γ RII
Linfocitos B	-	+
Linfocitos NK	+	+
Macrófagos	+	+
Neutrófilos	+	+

En un experimento similar, Se recogieron bazo de ratones Fc γ R completamente humanizados (homocigotos) y ratones de tipo silvestre, y se prepararon para FACS (como se ha descrito anteriormente). Los resultados se muestran en la Figura 7. En la Figura 5, se muestra el porcentaje de poblaciones de células de linfocitos separadas que expresan Fc γ RIIA humano, Fc γ RIIB humano, Fc γ RIIA humano, Fc γ RIIB humano, Fc γ RIIC humano o una combinación de los mismos en ratones homocigotos completamente humanizados.

Tabla 5

Linaje de linfocitos	hFc γ RIII	hFc γ RII	hFc γ RII/hFc γ RIII
Linfocitos B		100	
Linfocitos NK	30	-	-
Macrófagos	< 1	55	26
Neutrófilos	-		100

Como se muestra en el presente ejemplo, los ratones modificados genéticamente (genotipos tanto heterocigoto como homocigoto), generados de conformidad con el Ejemplo 5, expresaron el Fc γ RIIA humano en los linfocitos NK y macrófagos, el Fc γ RIIB humano en neutrófilos, el Fc γ RIIA humano en los neutrófilos y macrófagos, el Fc γ RIIB humano en los linfocitos B y el Fc γ RIIC humano en los linfocitos NK. El patrón de expresión de los genes Fc γ R humanos que se muestra en el presente ejemplo coincide con los patrones de expresión de estos genes en células auxiliares humanas.

Ejemplo 8: ADCC en ratones Fc γ R humanizados

Se analizaron esplenocitos aislados de ratones deficientes en genes Fc γ R (es decir, con desactivación), Fc γ RIIA/Fc γ RIIA (homocigotos), Fc γ RIIA/Fc γ RIIB/Fc γ RIIA/Fc γ RIIB/Fc γ RIIC (homocigotos) y de tipo silvestre para determinar su capacidad de realizar la ADCC en un ensayo de destrucción celular (como se ha descrito

anteriormente en el Ejemplo 2).

En resumen, Se aislaron poblaciones celulares y se separaron usando la tecnología MACS® (Miltenyi Biotec). En resumen, se cultivaron esplenocitos empobrecidos en linfocitos T y B durante dos semanas en presencia de IL-2 de ratón (500 U/ml). Los linfocitos NK expandidos resultantes se usaron como células efectoras en los ensayos de ADCC en una proporción de 50:1 (NK:Raji). Se recubrieron células Raji con 10 ug/ml de Ab 168 o Ab 735 (como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 3). Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Genotipo de linfocitos NK	% de ADCC	
	10 µg/ml de Ab 168	10 µg/ml de Ab 735
Tipo silvestre	89	72
Ratón FcγR KO	13	14
HO para FcγRIIIA-IIA humanos	78	85
HO para FcγRIIIA-IIIB-IIA-IIIB-IIC humanos	81	59

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MACDONALD, Lynn TU, Naxin GURER, Cagan STEVENS, Sean MURPHY, Andrew J.

<120> RATONES FCγR HUMANIZADOS

<130> 3070A-WO

<140> Por asignar

<141>

<150> 61/288.562

<151> 21-12-2009

<160> 38

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

<400> 1

accaggatat gacctgtaga g 21

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

<400> 2

gtccatgggt aagtagaac a 21

<210> 3

<211> 65

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> sintético		
5	<400> 3		
	atgcgagctc atgcatctat gtcgggtgcg gagaaagagg taatgcattc ttgcccaata	60	
	cttac	65	
	<210> 4		
	<211> 21		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sintético		
15	<400> 4		
	actcatggag cctcaacagg a	21	
	<210> 5		
20	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> sintético		
	<400> 5		
	atcctgagta tactatgaca aga	23	
30	<210> 6		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> sintético		
	<400> 6		
40	actagtgaga cgtgctactt c	21	
	<210> 7		
	<211> 21		
	<212> ADN		
45	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sintético		
	<400> 7		
50	ctccactca tgatctatag a	21	
	<210> 8		
	<211> 21		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sintético		
60	<400> 8		
	tggagcctca acaggactcc a	21	
	<210> 9		
	<211> 42		

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> sintético

 <400> 9
 gtccatgggt aagtagaac attcgctacc ttaggaccgt ta 42

 10 <210> 10
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> sintético

 <400> 10
 20 cgggtgcgga gaaagaggta atgcattctt gcccaatact ta 42

 <210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> sintético

 <400> 11
 30 gccagccaca aaggagataa tc 22

 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético

 40 <400> 12
 gcaacattta ggacaactcg gg 22

 <210> 13
 <211> 21
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético
 50
 <400> 13
 gatttctaa ccacctaccc c 21

 <210> 14
 55 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> sintético

 <400> 14
 tctttccaa tggcagtg 19

 65 <210> 15

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> sintético
 <400> 15
 cccaggtaag tcgtgatgaa acag 24
 10 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> sintético
 <400> 16
 20 ctcccactca tgatctatag a 21
 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 30 <400> 17
 tggagcctca acaggactcc a 21
 <210> 18
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 40 <400> 18
 cacacatctc ctggtgactt g 21
 <210> 19
 <211> 42
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> sintético
 <400> 19
 caactgccat tggaaaagac tcgagtgcca ttccattacc tc 42
 55 <210> 20
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> sintético
 <400> 20
 65 taaacccgcg gtggagctcg ccagccacaa aggagataat ca 42

5 <210> 21
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <400> 21
 10 ccatgggtaa gtagaaactc tagacccccg ggctcgataa ct 42
 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 20 <400> 22
 accaggatat gacctgtaga g 21
 <210> 23
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 30 <400> 23
 gtttctactt acccatggac 20
 <210> 24
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 40 <400> 24
 aaatacacac tgccacagac ag 22
 <210> 25
 <211> 22
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 50 <400> 25
 cctcttttgt gagtttctg tg 22
 55 <210> 26
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> sintético
 <400> 26
 65 gagtatacta tgacaagagc atc 23

5 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético

 10 <400> 27
 actagtgaga cgtgctactt c 21

 15 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> sintético

 <400> 28
 ctcccactca tgatctatag a 21

 25 <210> 29
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> sintético

 <400> 29
 ctttttatgg tcccacaatc ag 22

 35 <210> 30
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> sintético

 <400> 30
 gtccatgggt aagtagaaac attcgctacc ttaggaccgt ta 42
 45
 <210> 31
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> sintético

 <400> 31
 gcttatcgat accgtcgaca aatacacact gccacagaca gg 42
 55
 <210> 32
 <211> 317
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético

 65 <400> 32

Met	Thr	Met	Glu	Thr	Gln	Met	Ser	Gln	Asn	Val	Cys	Pro	Arg	Asn	Leu
1				5					10					15	
Trp	Leu	Leu	Gln	Pro	Leu	Thr	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ser	Ala	Asp
			20					25					30		
Ser	Gln	Ala	Ala	Ala	Pro	Pro	Lys	Ala	Val	Leu	Lys	Leu	Glu	Pro	Pro
		35					40					45			
Trp	Ile	Asn	Val	Leu	Gln	Glu	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gln	Gly
	50					55					60				
Ala	Arg	Ser	Pro	Glu	Ser	Asp	Ser	Ile	Gln	Trp	Phe	His	Asn	Gly	Asn
65					70					75				80	
Leu	Ile	Pro	Thr	His	Thr	Gln	Pro	Ser	Tyr	Arg	Phe	Lys	Ala	Asn	Asn
				85					90					95	
Asn	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Thr	Cys	Gln	Thr	Gly	Gln	Thr	Ser	Leu	Ser
			100					105					110		
Asp	Pro	Val	His	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Glu	Trp	Leu	Val	Leu	Gln	Thr
		115					120					125			
Pro	His	Leu	Glu	Phe	Gln	Glu	Gly	Glu	Thr	Ile	Met	Leu	Arg	Cys	His
	130					135					140				
Ser	Trp	Lys	Asp	Lys	Pro	Leu	Val	Lys	Val	Thr	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly
145					150					155				160	
Lys	Ser	Gln	Lys	Phe	Ser	His	Leu	Asp	Pro	Thr	Phe	Ser	Ile	Pro	Gln
				165					170					175	
Ala	Asn	His	Ser	His	Ser	Gly	Asp	Tyr	His	Cys	Thr	Gly	Asn	Ile	Gly
			180					185					190		
Tyr	Thr	Leu	Phe	Ser	Ser	Lys	Pro	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Gln	Val	Pro
	195						200					205			
Ser	Met	Gly	Ser	Ser	Ser	Pro	Met	Gly	Ile	Ile	Val	Ala	Val	Val	Ile
	210					215					220				
Ala	Thr	Ala	Val	Ala	Ala	Ile	Val	Ala	Ala	Val	Val	Ala	Leu	Ile	Tyr
225					230					235				240	
Cys	Arg	Lys	Lys	Arg	Ile	Ser	Ala	Asn	Ser	Thr	Asp	Pro	Val	Lys	Ala
				245					250					255	
Ala	Gln	Phe	Glu	Pro	Pro	Gly	Arg	Gln	Met	Ile	Ala	Ile	Arg	Lys	Arg
			260					265					270		
Gln	Leu	Glu	Glu	Thr	Asn	Asn	Asp	Tyr	Glu	Thr	Ala	Asp	Gly	Gly	Tyr
		275					280					285			
Met	Thr	Leu	Asn	Pro	Arg	Ala	Pro	Thr	Asp	Asp	Asp	Lys	Asn	Ile	Tyr
	290					295					300				
Leu	Thr	Leu	Pro	Pro	Asn	Asp	His	Val	Asn	Ser	Asn	Asn			
305					310					315					

<210> 33
 <211> 303
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<400> 33

Met Gly Ile Leu Ser Phe Leu Pro Val Leu Ala Thr Glu Ser Asp Trp

ES 2 671 188 T3

1	5	10	15
Ala Asp Cys Lys Ser Pro Gln Pro Trp Gly His Met Leu Leu Trp Thr			
	20	25	30
Ala Val Leu Phe Leu Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu			
	35	40	45
Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys			
	50	55	60
Arg Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn			
	65	70	75
Gly Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala			
	85	90	95
Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser			
	100	105	110
Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu			
	115	120	125
Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg			
	130	135	140
Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln			
	145	150	155
Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile			
	165	170	175
Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn			
	180	185	190
Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln			
	195	200	205
Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile Ile Val Ala Val Val Thr Gly			
	210	215	220
Ile Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys			
	225	230	235
Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Pro Glu Cys Arg Glu			
	245	250	255
Met Gly Glu Thr Leu Pro Glu Lys Pro Ala Asn Pro Thr Asn Pro Asp			
	260	265	270
Glu Ala Asp Lys Val Gly Ala Glu Asn Thr Ile Thr Tyr Ser Leu Leu			
	275	280	285
Met His Pro Asp Ala Leu Glu Glu Pro Asp Asp Gln Asn Arg Ile			
	290	295	300

<210> 34
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<400> 34

ES 2 671 188 T3

Met	Gly	Ile	Leu	Ser	Phe	Leu	Pro	Val	Leu	Ala	Thr	Glu	Ser	Asp	Trp
1				5					10					15	
Ala	Asp	Cys	Lys	Ser	Pro	Gln	Pro	Trp	Gly	His	Met	Leu	Leu	Trp	Thr
		20						25					30		
Ala	Val	Leu	Phe	Leu	Ala	Pro	Val	Ala	Gly	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Pro
		35						40					45		
Lys	Ala	Val	Leu	Lys	Leu	Glu	Pro	Gln	Trp	Ile	Asn	Val	Leu	Gln	Glu
	50					55					60				
Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Arg	Gly	Thr	His	Ser	Pro	Glu	Ser	Asp
65					70					75					80
Ser	Ile	Pro	Trp	Phe	His	Asn	Gly	Asn	Leu	Ile	Pro	Thr	His	Thr	Gln
				85					90					95	
Pro	Ser	Tyr	Arg	Phe	Lys	Ala	Asn	Asn	Asn	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Thr
				100				105					110		
Cys	Gln	Thr	Gly	Gln	Thr	Ser	Leu	Ser	Asp	Pro	Val	His	Leu	Thr	Val
		115					120					125			
Leu	Ser	Glu	Trp	Leu	Val	Leu	Gln	Thr	Pro	His	Leu	Glu	Phe	Gln	Glu
	130					135					140				
Gly	Glu	Thr	Ile	Val	Leu	Arg	Cys	His	Ser	Trp	Lys	Asp	Lys	Pro	Leu
145					150					155					160
Val	Lys	Val	Thr	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys	Ser	Lys	Lys	Phe	Ser	Arg
				165					170					175	
Ser	Asp	Pro	Asn	Phe	Ser	Ile	Pro	Gln	Ala	Asn	His	Ser	His	Ser	Gly
			180					185					190		
Asp	Tyr	His	Cys	Thr	Gly	Asn	Ile	Gly	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Ser	Ser	Lys
	195						200					205			
Pro	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Gln	Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Pro	Met	Gly	Ile
	210					215					220				
Ile	Val	Ala	Val	Val	Thr	Gly	Ile	Ala	Val	Ala	Ala	Ile	Val	Ala	Ala
225					230					235					240
Val	Val	Ala	Leu	Ile	Tyr	Cys	Arg	Lys	Lys	Arg	Ile	Ser	Ala	Asn	Ser
			245						250					255	
Thr	Asp	Pro	Val	Lys	Ala	Ala	Gln	Phe	Glu	Pro	Pro	Gly	Arg	Gln	Met
			260					265					270		
Ile	Ala	Ile	Arg	Lys	Arg	Gln	Pro	Glu	Glu	Thr	Asn	Asn	Asp	Tyr	Glu
	275						280					285			
Thr	Ala	Asp	Gly	Gly	Tyr	Met	Thr	Leu	Asn	Pro	Arg	Ala	Pro	Thr	Asp
	290					295					300				
Asp	Asp	Lys	Asn	Ile	Tyr	Leu	Thr	Leu	Pro	Pro	Asn	Asp	His	Val	Asn
305					310					315					320
Ser	Asn	Asn													

<210> 35

<211> 290

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

10

<400> 35

ES 2 671 188 T3

[illegible]

<210> 36
<211> 233
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 36

ES 2 671 188 T3

Met	Trp	Gln	Leu	Leu	Leu	Pro	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Ser	Ala
1				5					10					15	
Gly	Met	Arg	Thr	Glu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ala	Val	Val	Phe	Leu	Glu	Pro
			20					25					30		
Gln	Trp	Tyr	Ser	Val	Leu	Glu	Lys	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Lys	Cys	Gln
		35					40					45			
Gly	Ala	Tyr	Ser	Pro	Glu	Asp	Asn	Ser	Thr	Gln	Trp	Phe	His	Asn	Glu
	50					55				60					
Asn	Leu	Ile	Ser	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Ile	Asp	Ala	Ala	Thr
65					70				75						80
Val	Asn	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Thr	Asn	Leu	Ser	Thr	Leu
			85					90					95		
Ser	Asp	Pro	Val	Gln	Leu	Glu	Val	His	Ile	Gly	Trp	Leu	Leu	Leu	Gln
			100					105					110		
Ala	Pro	Arg	Trp	Val	Phe	Lys	Glu	Glu	Asp	Pro	Ile	His	Leu	Arg	Cys
		115					120					125			
His	Ser	Trp	Lys	Asn	Thr	Ala	Leu	His	Lys	Val	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asn
	130					135					140				
Gly	Lys	Asp	Arg	Lys	Tyr	Phe	His	His	Asn	Ser	Asp	Phe	His	Ile	Pro
145					150				155						160
Lys	Ala	Thr	Leu	Lys	Asp	Ser	Gly	Ser	Tyr	Phe	Cys	Arg	Gly	Leu	Val
			165					170					175		
Gly	Ser	Lys	Asn	Val	Ser	Ser	Glu	Thr	Val	Asn	Ile	Thr	Ile	Thr	Gln
			180					185					190		
Gly	Leu	Ala	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Phe	Ser	Pro	Pro	Gly	Tyr	Gln
	195						200					205			
Val	Ser	Phe	Cys	Leu	Val	Met	Val	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Asp	Thr	Gly
	210					215					220				
Leu	Tyr	Phe	Ser	Val	Lys	Thr	Asn	Ile							
225						230									

<210> 37
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<400> 37
 atcggggata gagatgtttg ccgcgatcgc ggtaccgggc 40

<210> 38
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<400> 38
 ttataccaag ttataccggt gcattcttgc ccaatactta 40

REIVINDICACIONES

1. Un ratón que comprende una modificación genética, en el que la modificación genética comprende un reemplazo de un fragmento genómico del locus de gen FcγR de baja afinidad de ratón endógeno, en el que dicho fragmento genómico comprende los genes de ratón codificantes de las subunidades α de FcγRIIB, FcγRIV y FcγRIII, con un fragmento genómico humano que codifica al menos dos genes FcγR humanos de baja afinidad seleccionados entre FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA y FcγRIIIB humanos, y comprendiendo el ratón una cadena γ de FcR funcional.
2. El ratón de la reivindicación 1, en el que los al menos dos genes FcγR humanos de baja afinidad son FcγRIIA y FcγRIIIA.
3. El ratón de la reivindicación 2, en el que el FcγRIIIA humano se expresa en los linfocitos NK del ratón.
4. El ratón de la reivindicación 2, en el que los genes FcγRIIA y FcγRIIIA comprenden variantes alélicas o polimorfismos.
5. El ratón de la reivindicación 1, en el que los genes FcγR humanos de baja afinidad son FcγRIIB, FcγRIIC y FcγRIIIB.
6. El ratón de la reivindicación 1, ratón que comprende variantes alélicas de FcγR de baja afinidad humanas, y las variantes alélicas se seleccionan del grupo que consiste en (a) variante alélica de FcγRIIA 131H, (b) variante alélica de FcγRIIIA 158V, (c) variante alélica de FcγRIIB 2321, (d) variante alélica de FcγRIIIB **caracterizada por** un alelo del antígeno de neutrófilo 2 (NA2), y (e) una combinación de las mismas.
7. Un ratón modificado genéticamente, en el que la modificación genética comprende un reemplazo de un fragmento genómico del locus de gen FcγR de baja afinidad de ratón endógeno, en el que dicho fragmento genómico comprende los genes de ratón que codifican las subunidades α de FcγRIIB, FcγRIII y FcγRIV, con un fragmento genómico humano que codifica al menos dos genes FcγR humanos de baja afinidad, en el que los al menos dos genes FcγR humanos de baja afinidad comprenden un gen que codifica una subunidad α de FcγRIIIA humano, en el que el ratón expresa una proteína FcγRIIIA humana asociada con una subunidad γ de FcR endógena de ratón, en el que la proteína FcγRIIIA humana se expresa en la superficie de un linfocito NK de ratón.
8. El ratón modificado genéticamente de la reivindicación 7, en el que el linfocito NK de ratón es un linfocito NK que circula por la sangre del ratón, y la proteína FcγRIIIA expresada en la superficie del linfocito NK de ratón se une a una inmunoadhesina o a un anticuerpo que comprende un Fc humano o un Fc humano modificado, en el que la inmunoadhesina o el anticuerpo se unen específicamente a una célula diana del ratón, y la unión de la inmunoadhesina o del anticuerpo a FcγRIIIA del linfocito NK media en la destrucción de los linfocitos NK de la célula diana.
9. El ratón modificado genéticamente de la reivindicación 8, en el que:
 - (a) la célula diana está infectada con un patógeno humano, y la inmunoadhesina o el anticuerpo se unen específicamente a un epítipo del patógeno humano; o
 - (b) la célula diana es una célula tumoral, y la inmunoadhesina o el anticuerpo se unen específicamente a un epítipo de la célula tumoral.
10. Un método de medición de la destrucción celular dependiente de anticuerpos, que comprende:
 - (a) administrar al ratón modificado genéticamente de la reivindicación 7 un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a una célula diana que no es un linfocito NK en el ratón, en el que el anticuerpo terapéutico comprende un Fc humano;
 - (b) medir un nivel de destrucción de células diana mediada por NK en el ratón o en una muestra de tejido del ratón; y
 - (c) determinar la cantidad de destrucción de células diana que está mediada por el anticuerpo terapéutico, midiendo de ese modo la destrucción celular dependiente de anticuerpos.
11. El método de la reivindicación 10, en el que los al menos dos genes FcγR humanos de baja afinidad comprenden además un gen que codifica una subunidad α de FcγR humano seleccionada entre una subunidad α de FcγRIIA, una subunidad α de FcγRIIB, una subunidad α de FcγRIIC, una subunidad α de FcγRIIIB y una combinación de las mismas.
12. El método de la reivindicación 10, en el que la célula diana es:
 - (a) un patógeno humano, y el anticuerpo terapéutico se une específicamente a un epítipo del patógeno humano;
 - (b) una célula de ratón infectada con un patógeno humano, y el anticuerpo terapéutico se une específicamente a un epítipo del patógeno humano;

- (c) una célula humana infectada con un patógeno humano, y el anticuerpo terapéutico se une específicamente a un epítipo del patógeno humano; o
- (d) una célula tumoral humana, y el anticuerpo terapéutico se une específicamente a un epítipo de la célula tumoral humana.

5

- 13. El método de la reivindicación 10, en el que la muestra de tejido es una muestra de sangre.
- 14. El método de la reivindicación 12(d), en el que el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo humano.

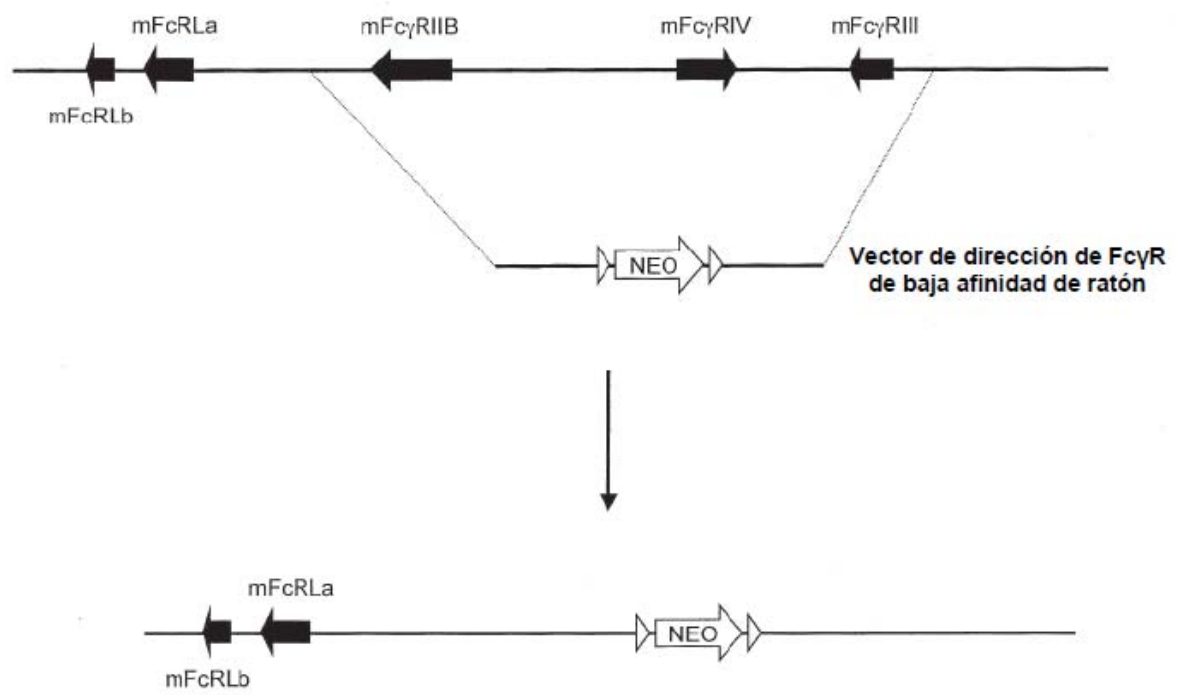


Figura 1

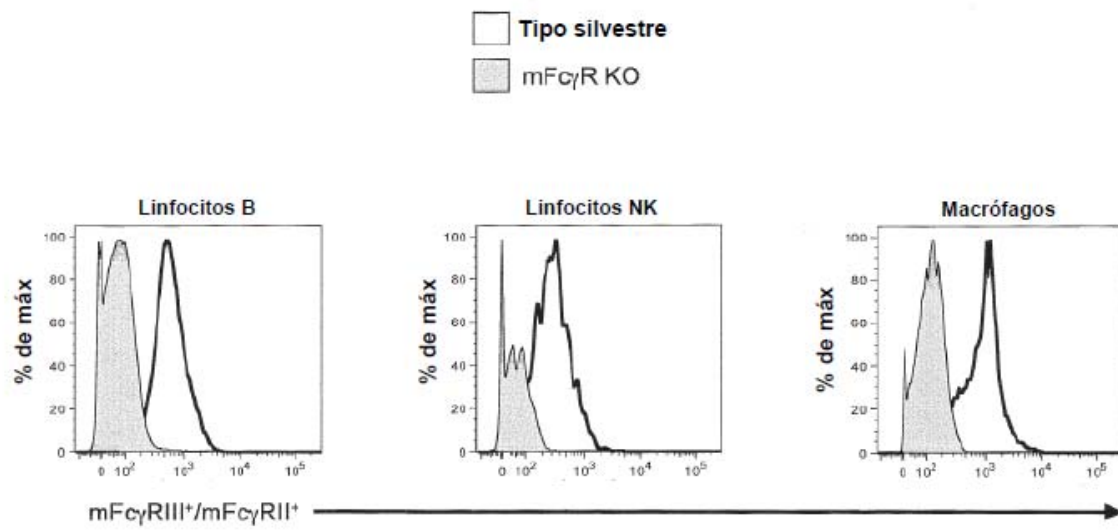


Figura 2

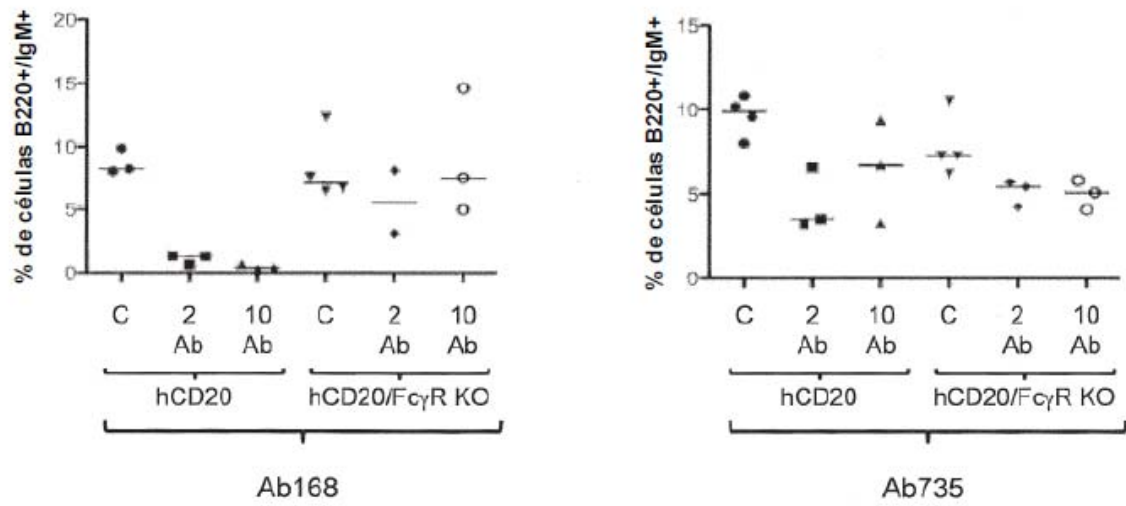


Figura 3A

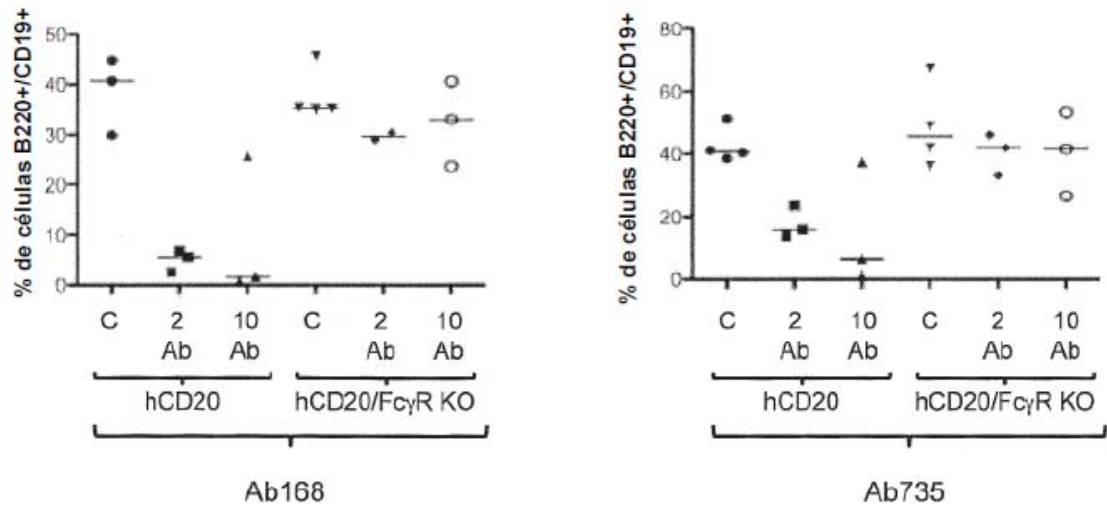


Figura 3B

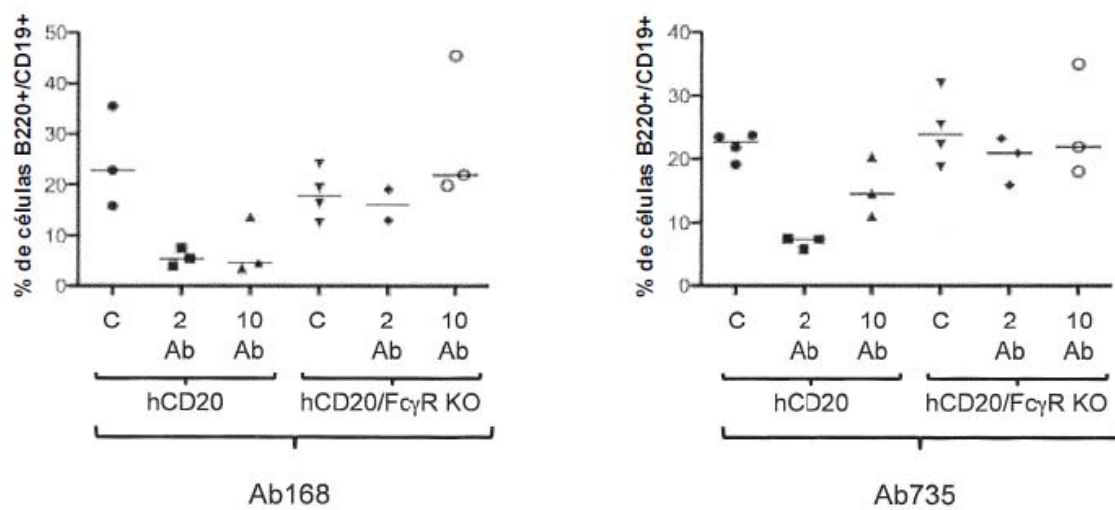


Figura 3C

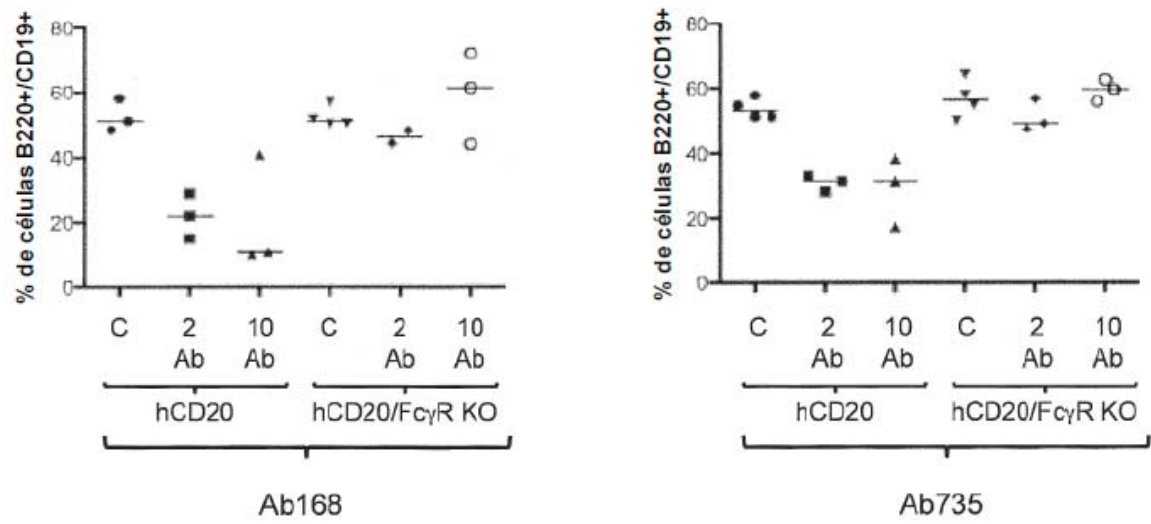


Figura 3D

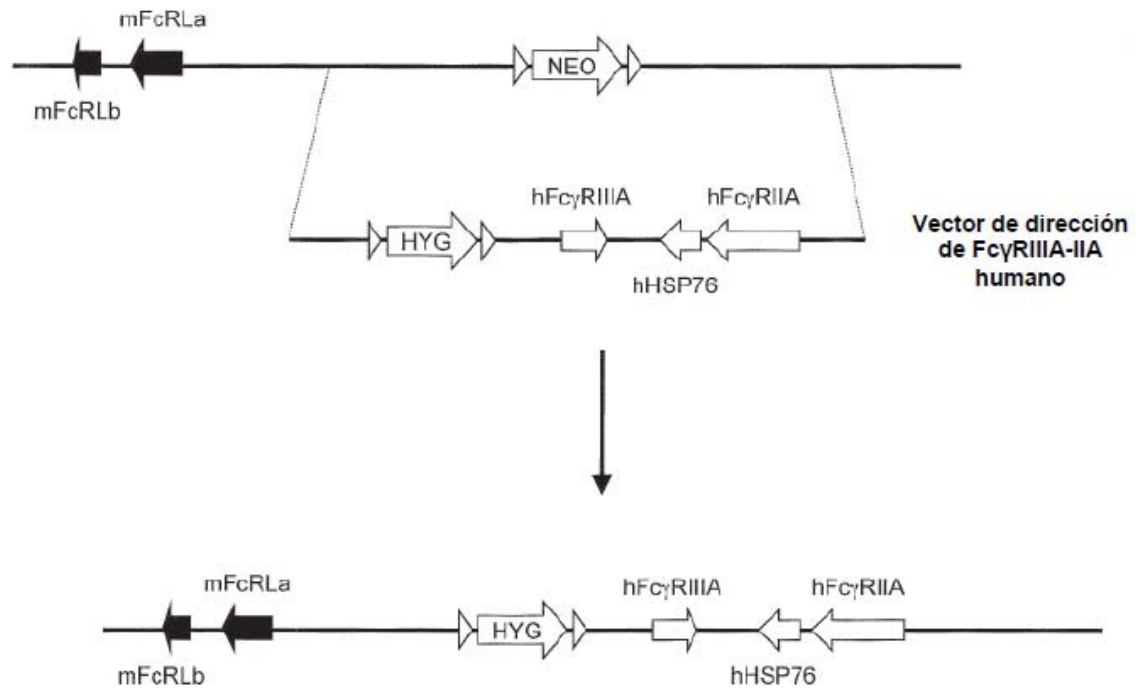


Figura 4

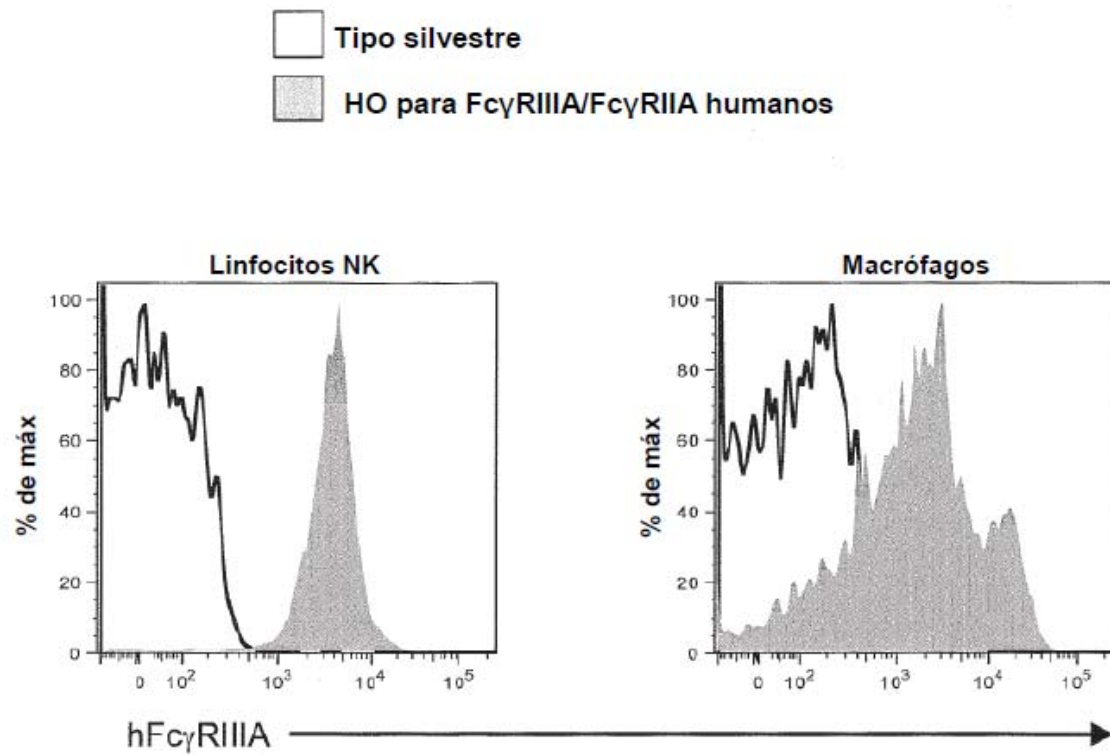


Figura 5A

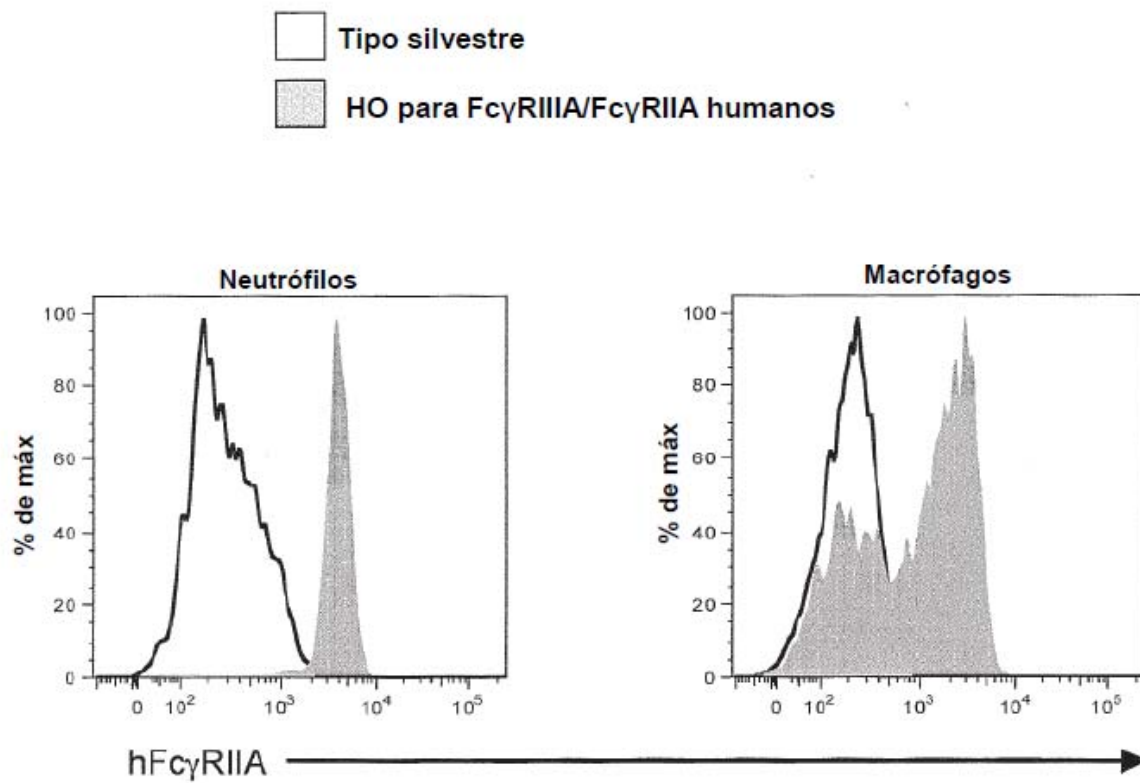


Figura 5B

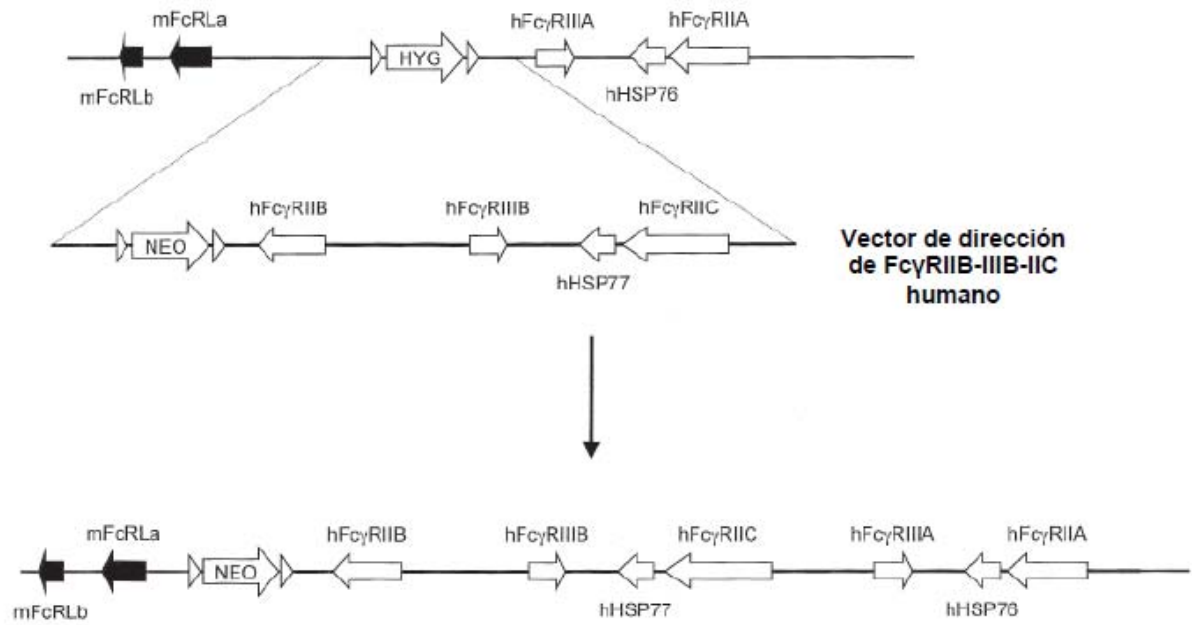


Figura 6

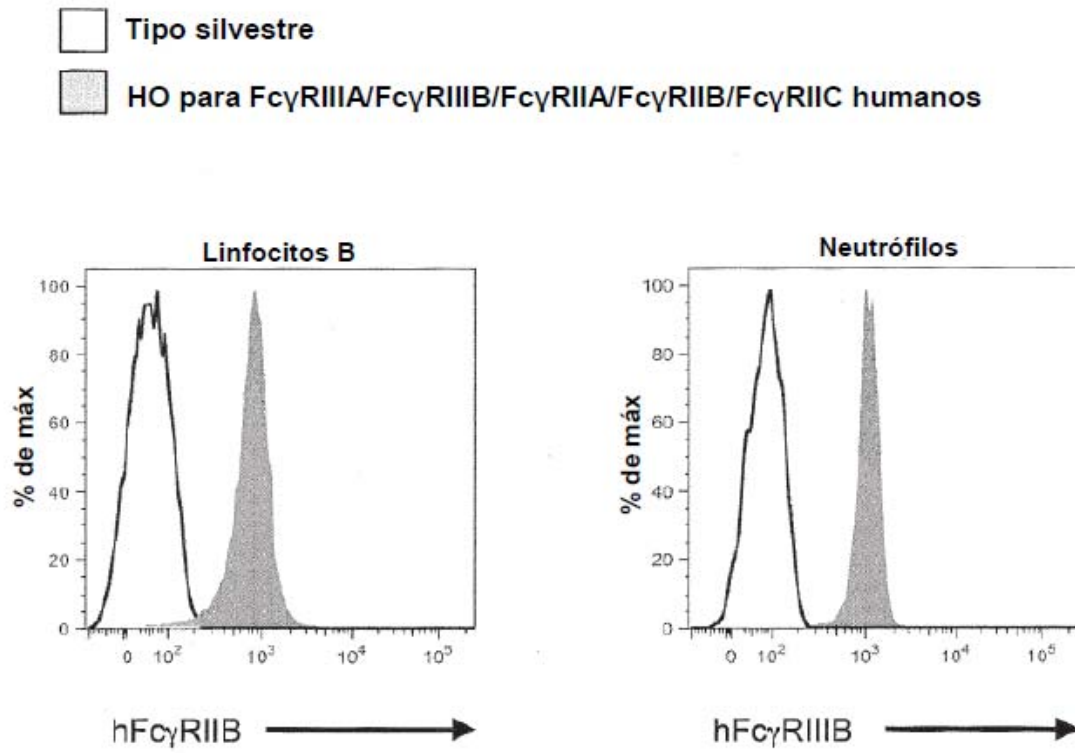


Figura 7