

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 972**

51 Int. Cl.:

**A01K 67/027** (2006.01)

**C07K 14/54** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2014 PCT/US2014/064806**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15077071**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2014 E 14803022 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 3071024**

54 Título: **Animales no humanos que tienen un gen de factor activador de células B humanizado**

30 Prioridad:

**19.11.2013 US 201361905983 P**

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

**20.02.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MCWHIRTER, JOHN;  
GURER, CAGAN;  
MACDONALD, LYNN y  
MURPHY, ANDREW J.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 700 972 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Animales no humanos que tienen un gen de factor activador de células B humanizado

Referencia cruzada con solicitud relacionada

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 61/905,983, presentada el 19 de noviembre de 2013.

Listado de secuencias

Un listado de secuencias en el archivo de texto ASCII, denominado 31015\_6800\_SEQ.txt de 22 KB y creado el 5 de noviembre de 2014, se presentó a la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos por medio de EFS-Web.

Antecedentes de la invención

10 La autoinmunidad se produce cuando los mecanismos naturales de un organismo para impedir que su sistema inmunitario ataque sus propias células y tejidos fallan. Las enfermedades, trastornos y afecciones causadas por este fallo, y por las respuestas inmunitarias autodirigidas aberrantes que se producen, se denominan enfermedades autoinmunitarias. Ejemplos notables de enfermedades, trastornos y afecciones autoinmunitarias incluyen diabetes mellitus, lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide (RA) y algunas alergias. Se estima que las  
15 enfermedades autoinmunitarias se encuentran entre las diez causas principales de muerte. La inversión en el desarrollo de terapias para enfermedades autoinmunitarias está en el rango de varios miles de millones de dólares y sistemas *in vivo* esenciales para evaluar, desarrollar y validar productos terapéuticos candidatos son necesarios para garantizar la seguridad y la eficacia del tratamiento. Además, tales sistemas *in vivo* son necesarios para determinar si los nuevos tratamientos pueden mantener la mejoría a largo plazo en los pacientes y, quizás, incluso pueden  
20 proporcionar curas para muchas enfermedades aún no abordadas. Tales sistemas *in vivo* proporcionan además una fuente para ensayos de las funciones relacionadas con el sistema inmunitario y hematopoyético humano *in vivo*, así como la identificación de novedosas terapias y vacunas.

Breve descripción de la invención

25 La presente invención se basa en el reconocimiento de que es conveniente modificar genéticamente animales no humanos para proporcionar sistemas de enfermedades autoinmunitarias *in vivo* mejorados para permitir la evaluación, el desarrollo y la validación de productos terapéuticos candidatos nuevos y existentes. La presente invención se basa además en el reconocimiento de que es conveniente modificar genéticamente animales no humanos para permitir la activación y supervivencia mejoradas de linfocitos humanos (por ejemplo, células B) posterior a la inmunización y posterior al injerto de células madre hematopoyéticas o células B humanas de donantes humanos. La presente  
30 invención se basa además en el reconocimiento de que los animales no humanos que tienen un gen *Baff* humanizado y/o que expresan, contienen, o producen de cualquier otra manera una proteína Baff humana o humanizada son convenientes, por ejemplo para usar en el injerto de células madre hematopoyéticas o células B humanas de donantes humanos.

35 La invención proporciona un roedor modificado genéticamente cuyo genoma comprende un reemplazo de un fragmento genómico de un gen *Baff* endógeno de roedor con un fragmento genómico humano que comprende los exones 3-6 de un gen *BAFF* humano para formar un gen *Baff* humanizado, en donde el reemplazo es en un locus *Baff* endógeno de roedor, en donde el gen *Baff* humanizado se encuentra bajo el control del promotor de *Baff* de roedor en dicho locus *Baff* endógeno de roedor y codifica una proteína Baff humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína BAFF humana codificada por dicho gen *BAFF* humano unida a una porción intracelular de la proteína Baff de roedor codificada por dicho gen *Baff* de roedor, y en donde dicho roedor modificado genéticamente expresa dicha proteína Baff humanizada.  
40

La invención proporciona además una célula o tejido aislado del roedor modificado genéticamente de la invención.

45 La invención proporciona adicionalmente una célula madre embrionaria (ES) de ratón, cuyo genoma comprende un reemplazo de los exones 3-6 y una porción del exón 7 de un gen *Baff* endógeno de ratón con un fragmento genómico humano que comprende los exones 3-6 de un gen *BAFF* humano para formar un gen *Baff* humanizado, en donde el reemplazo es en un locus *Baff* endógeno de ratón, en donde el gen *Baff* humanizado se encuentra bajo el control del promotor de *Baff* de ratón en dicho locus *Baff* endógeno de ratón, y codifica una proteína Baff humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína BAFF humana codificada por dicho gen *BAFF* humano unida a una porción intracelular de la proteína Baff de ratón codificada por dicho gen *Baff* de ratón.

50 La invención proporciona además un embrión de ratón generado a partir de la célula ES de la invención.

La invención proporciona además un método para producir un roedor que expresa una proteína Baff humanizada a partir de un locus *Baff* endógeno, el método comprende las etapas de: (a) reemplazar un fragmento genómico de un gen *Baff* endógeno de roedor en un locus *Baff* endógeno en una célula madre embrionaria (ES) de roedor con un

5 fragmento genómico que comprende los exones 3-6 de un gen *BAFF* humano para formar un gen *Baff* humanizado en el locus *Baff* endógeno de roedor, en donde el gen *Baff* humanizado se encuentra bajo el control del promotor de *Baff* de roedor en dicho locus *Baff* endógeno de roedor y codifica una proteína *Baff* humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína *BAFF* humana codificada por dicho gen *BAFF* humano unida a una porción intracelular de la proteína *Baff* de roedor codificada por dicho gen *Baff* de roedor; (b) obtener una célula ES de roedor modificada que comprende dicho gen *Baff* humanizado en el locus *Baff* endógeno de roedor; y, (c) crear un roedor con el uso de la célula ES modificada de (b).

10 La invención proporciona además un método para injertar células humanas en un ratón, en donde dicho ratón es capaz de recibir células humanas trasplantadas, el método comprende las etapas de: (a) proporcionar un ratón cuyo genoma comprende un reemplazo de los exones 3-6 y una porción del exón 7 de un gen *Baff* endógeno de ratón con un fragmento genómico humano que comprende los exones 3-6 de un gen *BAFF* humano para formar un gen *Baff* humanizado, en donde el reemplazo es en un locus *Baff* endógeno de ratón, en donde el gen *Baff* humanizado se encuentra bajo el control del promotor de *Baff* de ratón en dicho locus *Baff* endógeno de ratón y codifica una proteína *Baff* humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína *BAFF* humana codificada por dicho gen *BAFF* humano unida a una porción intracelular de la proteína *Baff* de ratón codificada por dicho gen *Baff* de ratón; y (b) trasplantar una o más células humanas en el ratón.

15 En la presente se describe un animal no humano que expresa un polipéptido *Baff* que comprende la porción extracelular de una proteína *BAFF* humana unida a la porción intracelular de una proteína *Baff* de ratón.

20 Una porción extracelular de una proteína *BAFF* humana puede estar codificada por los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano.

Los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano pueden ser al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % idénticos a los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano que aparece en la Tabla 3. Los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano pueden ser 100 % idénticos a los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano que aparece en la Tabla 3.

25 En la presente se describe además un animal no humano que no expresa de manera detectable una proteína *Baff* endógena de longitud completa. El animal no humano puede ser un roedor que no expresa de manera detectable una proteína *Baff* de roedor de longitud completa. El animal no humano puede ser un ratón que no expresa de manera detectable una proteína *Baff* de ratón de longitud completa cuya secuencia aparece en la Tabla 3.

30 Un polipéptido *Baff* como se describe en la presente puede expresarse a partir de un gen *Baff* modificado genéticamente en un locus *Baff* endógeno no humano. Un gen *Baff* modificado genéticamente puede comprender un exón 1 de *Baff* no humano. Un gen *Baff* modificado genéticamente puede comprender un exón 2 de *Baff* no humano. Un gen *Baff* modificado genéticamente puede comprender un exón 7 de *Baff* no humano en su totalidad o en parte. Un gen *Baff* modificado genéticamente puede comprender un exón 1 y un exón 2 de *Baff* no humano. Un gen *Baff* modificado genéticamente puede comprender un exón 1 de *Baff* no humano, un exón 2 de *Baff* no humano, un exón 7 de *Baff* no humano en su totalidad o en parte, o una combinación de estos. Un exón 7 de *Baff* no humano puede comprender en parte una región no traducida (UTR) en 3' de *Baff* no humano y una señal de poliadenilación de *Baff* no humano.

35 En la presente se describe adicionalmente un animal no humano que comprende un gen *Baff* modificado genéticamente que comprende uno o más exones de un gen *BAFF* humano (es decir, un gen *Baff* humanizado) unido operativamente a un promotor de *Baff*. Un promotor de *Baff* como se describe en la presente puede ser un promotor de *Baff* no humano. Un promotor de *BAFF* descrito en la presente puede ser un promotor de *Baff* humano.

40 En la presente se describe además un gen *Baff* humanizado como se describe en la presente que comprende los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano. Un gen *Baff* humanizado puede comprender además un exón 1 de *Baff* no humano. Un gen *Baff* humanizado puede comprender además un exón 2 de *Baff* no humano. Un gen *BAFF* humanizado puede comprender además un exón 7 de *Baff* no humano en su totalidad o en parte. Un gen *Baff* humanizado puede comprender un exón 1, un exón 2 de *Baff* no humano y un exón 7 de *Baff* no humano en su totalidad o en parte. Un exón 7 de *Baff* no humano puede comprender en parte una región no traducida (UTR) en 3' de *Baff* no humano y una señal de poliadenilación de *Baff* no humano.

45 Los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano pueden ser al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % idénticos a los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano que aparece en la Tabla 3. Los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano pueden ser 100 % idénticos a los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano que aparece en la Tabla 3.

50 Un animal no humano como se describe en la presente puede ser un roedor. Un roedor descrito en la presente puede seleccionarse de un ratón o una rata.

55 En la presente se describe además un locus (o gen) *Baff* humanizado que comprende uno o más exones de un gen *Baff* no humano unido operativamente a uno o más exones de un gen *BAFF* humano.

En la presente se describe además un locus (o gen) *Baff* humanizado que comprende los exones 1 y 2 de *Baff* no humano unidos operativamente a los exones 3 a 6 de *BAFF* humano. Un locus (o gen) *Baff* humanizado puede comprender además regiones no traducidas (UTR) en 5' y 3' no humanas que flanquean un exón 1 de *Baff* no humano y un exón 6 de *BAFF* humano.

- 5 En la presente se describe además un polipéptido *Baff* codificado por un locus, o gen, *Baff* humanizado como se describe en la presente.

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

15 En la presente se describe además una célula o tejido no humano (por ejemplo, de roedor) aislado cuyo genoma incluye un gen (o locus) *Baff* que comprende uno o más exones de un gen *Baff* no humano unidos operativamente a uno o más exones de un gen *BAFF* humano. En la presente se describe además una célula o tejido no humano (por ejemplo, de roedor) aislado cuyo genoma incluye un gen (o locus) *Baff* que comprende los exones 1 y 2 de *Baff* no humano unidos operativamente a los exones 3 a 6 de *BAFF* humano, en donde el gen (o locus) *Baff* comprende además las regiones no traducidas (UTR) en 5' y 3' no humanas que flanquean el exón 1 de *Baff* no humano y el exón 6 de *BAFF* humano. Un gen (o locus) *Baff* puede comprender una secuencia que codifica un polipéptido *BAFF* que comprende los residuos 142 a 285 de una proteína *BAFF* humana.

20 En la presente se describe además una célula madre embrionaria (ES) no humana cuyo genoma comprende un gen (o locus) *Baff* como se describe en la presente. La célula ES puede comprender un gen *Baff* que codifica la porción extracelular de una proteína *BAFF* humana unida a la porción intracelular de una proteína *Baff* de ratón. La célula ES puede comprender un gen *Baff* que comprende los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano. La célula ES puede ser una célula ES de roedor. Una célula ES no humana como se describe en la presente puede ser una célula ES de ratón o rata.

25 En la presente se describe además el uso de una célula madre embrionaria no humana como se describe en la presente para producir un animal no humano. Una célula madre embrionaria no humana puede ser murina y puede usarse para producir un ratón que comprende un gen *Baff* como se describe en la presente.

30 En la presente se describe además un embrión no humano que comprende, se produce, se obtiene, o se genera a partir de una célula madre embrionaria no humana que comprende un gen *Baff* como se describe en la presente. Un embrión no humano descrito en la presente puede ser un embrión de roedor. Un embrión de roedor como se describe en la presente puede ser un embrión de ratón o rata.

35 En la presente se describe además un método para producir un animal no humano que expresa una proteína *Baff* a partir de un gen *Baff* humanizado en un locus *Baff* endógeno, en donde la proteína *Baff* comprende una secuencia humana, el método comprende las etapas de transformar un gen (o locus) *Baff* endógeno en una célula madre embrionaria (ES) no humana con un fragmento genómico que comprende una secuencia de nucleótidos humana que codifica una proteína *BAFF* humana en su totalidad o en parte, obtener una célula madre embrionaria (ES) no humana modificada que comprende un gen *Baff* humanizado en un locus *Baff* endógeno que comprende dicha secuencia humana, y crear un animal no humano con el uso de dicha célula madre embrionaria (ES) modificada.

40 Dicha secuencia de nucleótidos humana puede comprender los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano. Dicha secuencia de nucleótidos humana puede comprender los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano que son al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % idénticos a los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano que aparece en la Tabla 3. Dicha secuencia de nucleótidos humana puede comprender los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano que son 100 % idénticos a los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano que aparece en la Tabla 3.

45 Dicha secuencia de nucleótidos humana puede codificar los residuos de aminoácidos 142 a 285 de una proteína *BAFF* humana. Dicha secuencia de nucleótidos humana codifica los residuos de aminoácidos 142-285 de una proteína *BAFF* humana que son al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % idénticos a los residuos de aminoácidos 142-285 de una proteína *BAFF* humana que aparece en la Tabla 3. Dicha secuencia de nucleótidos humana puede codificar los residuos de aminoácidos 142-285 de una proteína *BAFF* humana que son 100 % idénticos a los residuos de aminoácidos 142-285 de una proteína *BAFF* humana que aparece en la Tabla 3.

50 En la presente se describe además un ratón o una rata producido por, u obtenido (o que puede obtenerse) a partir de, un método como se describe en la presente. Un ratón o una rata producido por, u obtenido (o que puede obtenerse) a partir de, un método como se describe en la presente puede no expresar de manera detectable una proteína *Baff* endógena (por ejemplo, de ratón o rata) de longitud completa.

5 En la presente se describe además un método para proporcionar un ratón cuyo genoma incluye un gen *Baff* que codifica la porción extracelular de una proteína BAFF humana unida a la porción intracelular de una proteína Baff de ratón, el método comprende modificar el genoma de un ratón de manera que comprenda un gen *Baff* que codifica la porción extracelular de una proteína BAFF humana unida a la porción intracelular de una proteína Baff de ratón para proporcionar de este modo dicho ratón. Un gen *Baff* puede ser un gen *Baff* como se describe en la presente. Un gen *Baff* puede ser uno que codifica una proteína cuya secuencia refleja una proteína Baff humanizada que aparece en la Tabla 3. Un gen *Baff* puede comprender los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano.

10 En la presente se describe además un gen *Baff* humanizado como se describe en la presente que comprende los exones 3, 4, 5 y 6 de un gen *BAFF* humano. Una porción extracelular de una proteína Baff humanizada como se describe en la presente puede comprender los aminoácidos correspondientes a los residuos 142-285 de una proteína BAFF humana que aparece en la Tabla 3. Una proteína Baff humanizada como se describe en la presente puede comprender una secuencia de una proteína Baff humanizada que aparece en la Tabla 3. Un gen *Baff* humanizado como se describe en la presente puede unirse operativamente a un promotor de *Baff* de ratón.

15 En la presente se describe además un método para injertar células humanas en un ratón, el método comprende las etapas de proporcionar un ratón cuyo genoma comprende un gen *Baff* que codifica la porción extracelular de una proteína BAFF humana unida a la porción intracelular de una proteína Baff de ratón (como se describe en la presente), y trasplantar una o más células humanas en el ratón. El método puede comprender además una etapa de ensayo del injerto de la una o más células humanas en el ratón. La etapa de ensayo puede comprender comparar el injerto de la una o más células humanas con el injerto en uno o más ratones de tipo silvestre o en uno o más ratones cuyo genoma  
20 no comprende un gen *Baff* que codifica la porción extracelular de una proteína BAFF humana unida a la porción intracelular de una proteína Baff de ratón.

Las células humanas pueden ser células madre hematopoyéticas. Las células humanas pueden ser células B humanas.

25 Las células humanas pueden trasplantarse por vía intravenosa. Las células humanas pueden trasplantarse por vía intraperitoneal. Las células humanas pueden trasplantarse por vía subcutánea.

30 En la presente se describen además métodos para la identificación o validación de un fármaco o vacuna, el método comprende las etapas de suministrar un fármaco o vacuna a un animal no humano como se describe en la presente, y controlar uno o más de la respuesta inmunitaria al fármaco o vacuna, el perfil de seguridad del fármaco o vacuna, o el efecto sobre una enfermedad o afección. El control del perfil de seguridad puede incluir la determinación de si el animal no humano exhibe un efecto secundario o reacción adversa como resultado del suministro del fármaco o vacuna. Un efecto secundario o reacción adversa puede seleccionarse de morbilidad, mortalidad, alteración del peso corporal, alteración del nivel de una o más enzimas (por ejemplo, hepáticas), alteración en el peso de uno o más órganos, pérdida de función (por ejemplo, sensorial, motora, de órganos, etcétera), aumento de la susceptibilidad a una o más enfermedades, alteraciones al genoma del animal no humano, aumento o disminución del consumo de alimentos y complicaciones de una o más enfermedades.  
35

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

Los animales no humanos como se describe en la presente pueden ser roedores, preferentemente un ratón o una rata.

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

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

Breve descripción de las figuras

El dibujo incluido en la presente, que comprende las siguientes Figuras, solo tiene propósitos de ilustración y no de limitación.

50 La Figura 1 muestra un diagrama, no a escala, de la organización genómica de los genes del factor activador de células B (*BAFF*) humano y de ratón. Los exones se enumeran debajo de cada exón.

La Figura 2 muestra un diagrama, no a escala, de un método ilustrativo para la humanización de un gen de factor activador de células B (*Baff*) no humano. Las secuencias no humanas se muestran como símbolos negros, cerrados. Las secuencias humanas se muestran en símbolos abiertos, de relleno diagonal. CM: Casete de selección por

cloranfenicol. Hyg: casete de selección por higromicina. SDC NEO: casete de selección por neomicina autoeliminable. Spec: casete de selección por espectinomina. Frt: secuencia del sitio de reconocimiento diana de la recombinasa Flp. *LoxP*: secuencia del sitio de reconocimiento diana de la recombinasa Cre. Se indican los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción (por ejemplo, AsiSI, I-CeuI, etcétera).

## 5 Definiciones

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

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

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

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

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

30 El término "*conservador*" como se usa en la presente para describir una sustitución de aminoácido conservadora se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservadora no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de un receptor de unirse a un ligando. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen cadenas laterales alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; cadenas laterales hidroxialifáticas tales como serina y treonina; cadenas laterales que contienen grupo amida tales como asparagina y glutamina; cadenas laterales aromáticas tales como fenilalanina, tirosina, y triptófano; cadenas laterales básicas tales como lisina, arginina e histidina; cadenas laterales ácidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y, cadenas laterales que contienen azufre tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/tirosina, lisina/arginina, alanina/valina, glutamato/aspartato, y asparagina/glutamina. Una sustitución de aminoácido conservadora puede ser una sustitución de cualquier residuo nativo en una proteína con alanina, como se usa, por ejemplo, en la mutagénesis por barrido de alanina. Una sustitución conservadora puede ser una que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en Gonnet y otros (1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45. Una sustitución puede considerarse "moderadamente conservadora" si tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

35 El término "*interrupción*" como se usa en la presente se refiere al resultado de un evento que interrumpe (por ejemplo, por medio de recombinación homóloga) un ADN. Una interrupción puede lograr o representar una delección, inserción, inversión, modificación, reemplazo, sustitución, o cualquier combinación de estos, de una(s) secuencia(s) de ADN. Una interrupción puede lograr o representar la introducción de una mutación, tal como una mutación con cambio de sentido, sin sentido, o de desplazamiento del marco de lectura, o cualquier combinación de estas, en una(s) secuencia(s) codificante(s) en el ADN. Una interrupción puede producirse en un gen o locus génico endógeno para una célula. Las inserciones pueden incluir la inserción de genes completos o fragmentos de genes, por ejemplo exones, en un sitio endógeno en una célula o genoma. Las inserciones pueden introducir secuencias que son de un origen distinto al de una secuencia endógena en la que se insertan. Una interrupción puede aumentar la expresión y/o

actividad de un gen o un producto génico (por ejemplo, de una proteína codificada por un gen). Una interrupción puede disminuir la expresión y/o actividad de un gen o un producto génico. Una interrupción puede alterar la secuencia de un gen o un producto génico (por ejemplo, una proteína codificada). Una interrupción puede truncar o fragmentar un gen o un producto génico (por ejemplo, una proteína codificada). Una interrupción puede extender un gen o un producto génico; y una interrupción de este tipo puede lograr el ensamblaje de una proteína de fusión. Una interrupción puede afectar el nivel pero no la actividad de un gen o un producto génico. Una interrupción puede afectar la actividad pero no el nivel de un gen o un producto génico. Una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre el nivel de un gen o un producto génico. Una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre el nivel o la actividad de un gen o un producto génico.

La frase "*locus endógeno*" o "*gen endógeno*" como se usa en la presente descripción se refiere a un locus genético que se encuentra en un organismo original o de referencia antes de la introducción de una interrupción (por ejemplo, delección, inserción, inversión, modificación, reemplazo, sustitución, o una combinación de estos como se describe en la presente). Un locus endógeno puede tener una secuencia que se encuentra en la naturaleza. Un locus endógeno puede ser de tipo silvestre. Un organismo de referencia que contiene un locus endógeno como se describe en la presente puede ser un organismo de tipo silvestre. Un organismo de referencia que contiene un locus endógeno como se describe en la presente puede ser un organismo modificado genéticamente. Un organismo de referencia que contiene un locus endógeno como se describe en la presente puede ser un organismo criado en el laboratorio (ya sea de tipo silvestre o modificado genéticamente).

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

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

El término "*célula huésped*", como se usa en la presente descripción, se refiere a una célula en la cual se ha introducido un ácido nucleico o una proteína heterólogos (por ejemplo, exógenos). Después de leer esta descripción los expertos entenderán que tales términos no se refieren solamente a una célula particular en cuestión, sino que se usan también para referirse a la progenie de esa célula. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en las generaciones posteriores ya sea debido a una mutación o a influencias del ambiente, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula original, pero aun así los expertos en la técnica entienden que se incluye dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en la presente. Una célula huésped puede ser o puede comprender una célula procariota o eucariota. En general, una célula huésped es cualquier célula que sea adecuada para recibir y/o producir un ácido nucleico o una proteína heterólogos, independientemente del reino de la vida al que pertenece la célula. Las células ilustrativas que pueden utilizarse como células huésped de acuerdo con la presente descripción incluyen las de organismos procariotas y eucariotas (unicelulares o pluricelulares), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., etcétera), células de micobacterias, células fúngicas, células de levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etcétera), células vegetales, células de insectos (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insectos infectadas con baculovirus, *Trichoplusia ni*, etcétera), células de animales no humanos, células humanas, o fusiones de células tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. La célula puede ser una célula humana, de mono, simio, hámster, rata, o ratón. La célula puede ser eucariota y puede seleccionarse de las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), célula de retina, Vero, CV1, d (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (por ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral, y una línea celular que se deriva de una célula mencionada anteriormente. La célula puede comprender uno o más genes virales, por ejemplo, una célula de la retina que expresa un gen viral (por ejemplo, una célula PER.C6™). Una célula huésped puede ser o puede comprender una célula aislada. Una célula huésped puede ser parte de un tejido. Una célula huésped puede ser parte de un organismo.

El término "*humanizado*," se usa en la presente de acuerdo con su significado que se entiende en la técnica para referirse a ácidos nucleicos o proteínas cuyas estructuras (es decir, secuencias de nucleótidos o aminoácidos) incluyen porciones que corresponden sustancialmente o idénticamente a versiones de los ácidos nucleicos o proteínas relevantes que se encuentran en la naturaleza en animales no humanos y que son distinguibles de las versiones correspondientes que se encuentran en la naturaleza en seres humanos, e incluyen además porciones cuyas estructuras difieren de las presentes en las versiones de los animales no humanos y en lugar de eso corresponden de manera más cercana a estructuras comparables que se encuentran en las versiones humanas. Un gen "humanizado" puede ser uno que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos sustancialmente igual a la de un polipéptido humano (por ejemplo, una proteína humana o porción de esta – por ejemplo, una porción característica de esta). Solo para proporcionar un ejemplo, en el caso de un receptor de membrana, un gen "humanizado" puede

codificar un polipéptido con una porción extracelular cuya secuencia de aminoácidos es idéntica o sustancialmente idéntica a la de una porción extracelular humana, y cuya secuencia restante es idéntica o sustancialmente idéntica a la de un polipéptido no humano (por ejemplo, de ratón). Un gen humanizado puede comprender al menos una porción de una secuencia de ADN de un gen humano. Un gen humanizado puede comprender una secuencia de ADN completa que se encuentra en un gen humano. Una proteína humanizada puede tener una secuencia de aminoácidos que comprende una porción que aparece en una proteína humana. Una proteína humanizada puede tener una secuencia de aminoácidos cuya secuencia completa se encuentra en una proteína humana. Una proteína humanizada puede expresarse a partir de un locus endógeno de un animal no humano, cuyo locus endógeno corresponde al homólogo u ortólogo del gen humano relevante que codifica la proteína (por ejemplo, en el que una proteína humanizada tiene una secuencia de aminoácidos cuya secuencia completa se encuentra en una proteína humana).

El término "*identidad*" como se usa en la presente en relación con una comparación de secuencias, se refiere a la identidad determinada mediante cualquiera de una serie de algoritmos diferentes conocidos en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos. Las identidades como se describe en la presente pueden determinarse con el uso de un alineamiento ClustalW v. 1.83 (lento) que emplea una penalización por apertura de brecha de 10,0, una penalización por extensión de brecha de 0,1, y usa una matriz de similitud de Gonnet (MACVECTOR™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008). Como se usa en la presente, el término "*identidad*" se refiere a la relación general entre moléculas poliméricas, *por ejemplo*, entre moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas polipeptídicas. Las moléculas poliméricas pueden considerarse "sustancialmente idénticas" entre sí si sus secuencias son al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 % idénticas. Como entenderán los expertos en la técnica, se dispone de una variedad de algoritmos que permiten la comparación de secuencias para determinar su grado de homología, que incluyen permitir brechas de longitud designada en una secuencia con relación a otra cuando se considera qué residuos "corresponden" entre sí en secuencias diferentes. El cálculo del porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, puede realizarse mediante el alineamiento de las dos secuencias para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse brechas en una o ambas de una primera y una segunda secuencias de ácidos nucleicos para su alineamiento óptimo y las secuencias no correspondientes pueden ignorarse para propósitos de comparación). La longitud de una secuencia alineada para propósitos de comparación puede ser al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o sustancialmente 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Después se comparan los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de brechas, y la longitud de cada brecha, que es necesario introducir para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. Los algoritmos representativos y los programas informáticos útiles para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos incluyen, por ejemplo, el algoritmo de Meyers y Miller (CABIOS, 1989, 4: 11-17), que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que usa una tabla de pesos de residuos PAM120, una penalización por longitud de brecha de 12 y una penalización de brecha de 4. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse, alternativamente, por ejemplo con el uso del programa GAP en el paquete de software GCG que usa una matriz NWSgapdna.CMP.

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

polipéptido "aislado" en la medida que se ha separado de otros componentes a) con los que se asocia en la naturaleza; y/o b) con los que se asociaba cuando se produjo inicialmente.

La frase "*animal no humano*" como se usa en la presente se refiere a un organismo vertebrado que no es un ser humano. Un animal no humano puede ser un ciclóstomo, un pez óseo, un pez cartilaginoso (por ejemplo, un tiburón o una raya), un anfibio, un reptil, un mamífero, o un ave. Un mamífero no humano puede ser un primate, una cabra, una oveja, un cerdo, un perro, una vaca, o un roedor. Un animal no humano puede ser un roedor tal como una rata o un ratón.

La frase "*ácido nucleico*", como se usa en la presente descripción, en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que sea una cadena oligonucleotídica, o que pueda incorporarse a esta. Un ácido nucleico puede ser un compuesto y/o sustancia que es una cadena oligonucleotídica o que puede incorporarse a esta por medio de un enlace fosfodiéster. Como resultará evidente a partir del contexto, "ácido nucleico" puede referirse a uno o más residuos de ácido nucleico individuales (por ejemplo, nucleótidos y/o nucleósidos); "ácido nucleico" puede referirse a una cadena oligonucleotídica que comprende residuos de ácido nucleico individuales. Un "ácido nucleico" puede ser o puede comprender ARN; un "ácido nucleico" puede ser o puede comprender ADN. Un ácido nucleico puede ser, comprender, o consistir en uno o más residuos de ácido nucleico naturales. Un ácido nucleico puede ser, comprender, o consistir en uno o más análogos de un residuo de ácido nucleico natural. Un análogo de ácido nucleico puede diferir de un residuo de ácido nucleico natural en el hecho de que no utiliza una cadena principal con enlaces fosfodiéster. Por ejemplo, un ácido nucleico como se describe en la presente puede comprender, o consistir en uno o más "ácidos nucleicos peptídicos", que se conocen en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en la cadena principal. Alternativamente o adicionalmente, un ácido nucleico puede tener uno o más enlaces fosforotioato y/o 5'-N-fosforamidita en lugar de enlaces fosfodiéster. Un ácido nucleico puede ser, comprender, o consistir en uno o más nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina, y desoxicitidina). Un ácido nucleico puede ser, comprender, o consistir en uno o más análogos de nucleósidos (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolopirimidina, 3 -metil adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinil-citidina, C-5 propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinil-uridina, C5 -propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina, 2-tiocitidina, bases metiladas, bases intercaladas, y combinaciones de estos). Un ácido nucleico puede comprender uno o más azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa, y hexosa) en comparación con los de ácidos nucleicos naturales (es decir, comprende uno o más análogos de un azúcar de nucleósido natural). Un ácido nucleico puede tener una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico funcional tal como un ARN o una proteína. Un ácido nucleico puede tener una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más intrones. Los expertos en la técnica apreciarán que se dispone de una variedad de tecnologías conocidas en la técnica para la producción de ácidos nucleicos. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden prepararse mediante un método seleccionado del grupo que consiste en aislamiento a partir de una fuente natural, síntesis enzimática por polimerización basada en una plantilla complementaria (in vivo o in vitro), reproducción en una célula o sistema recombinante, síntesis química, y combinaciones de estos. Un ácido nucleico puede ser de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 20, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1 500, 2 000, 2 500, 3 000, 3 500, 4 000, 4 500, 5 000 o más residuos de longitud. Un ácido nucleico puede ser monocatenario; o un ácido nucleico puede ser parcialmente o completamente bicatenario (es decir, comprende al menos dos cadenas de ácido nucleico individuales cuyas secuencias incluyen elementos complementarios que se hibridan entre sí). Un ácido nucleico puede tener una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un elemento que codifica, o es el complemento de una secuencia que codifica, un polipéptido. Un ácido nucleico puede tener actividad enzimática.

La frase "*unido operativamente*", como se usa en la presente, se refiere a una yuxtaposición física (por ejemplo, en el espacio tridimensional) de componentes o elementos que interactúan, directamente o indirectamente entre sí, o de cualquier otra manera se coordinan entre sí para participar en un evento biológico, cuya yuxtaposición logra o permite tal interacción y/o coordinación. Solo para proporcionar un ejemplo, se dice que una secuencia de control (por ejemplo, una secuencia de control de la expresión) en un ácido nucleico está "unida operativamente" a una secuencia codificante cuando se ubica con relación a la secuencia codificante de manera que su presencia o ausencia afecta la expresión y/o actividad de la secuencia codificante. La "unión operativa" puede involucrar la unión covalente de componentes o elementos relevantes entre sí. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente, sin embargo, que la unión covalente puede no ser necesaria para lograr la unión operativa eficaz. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos de control unidas operativamente a las secuencias codificantes que controlan pueden ser contiguas al gen de interés. Alternativamente o adicionalmente, una o más de tales secuencias de control pueden actuar en trans o a una distancia para controlar una secuencia codificante de interés. El término "secuencia de control de la expresión" como se usa en la presente se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias y/o suficientes para efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que se unen. Las secuencias control de la expresión pueden ser o comprender secuencias de iniciación de la transcripción, de terminación, promotoras y/o potenciadoras adecuadas; señales eficientes para el procesamiento de ARN tales como señales de corte y empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficiencia de la traducción (por ejemplo, la secuencia consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de las proteínas; y/o secuencias que potencian la secreción de proteínas. Una o más secuencias de control pueden ser preferentemente

o exclusivamente activas en una célula u organismo huésped particular, o un tipo de estos. Solo para proporcionar un ejemplo, en los procariotas, las secuencias de control incluyen típicamente promotor, sitio de unión al ribosoma, y secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas las secuencias de control pueden incluir típicamente promotores, potenciadores, y/o secuencias de terminación de la transcripción. Los expertos en la técnica apreciarán a partir del contexto que, en muchos casos, el término "secuencias de control" se refiere a componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y puede incluir componentes cuya presencia es ventajosa para la expresión (que incluyen, por ejemplo, secuencias líderes, secuencias de orientación, y/o secuencias de parejas de fusión).

El término "*polipéptido*", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Un polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos que se produce en la naturaleza. Un polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos que no se produce en la naturaleza. Un polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos que está modificada genéticamente en el hecho de que se diseña y/o se produce a través de la acción del hombre.

El término "*recombinante*", como se usa en la presente, se destina a referirse a polipéptidos (por ejemplo, proteínas de factor activador de células B como se describen en la presente) que se diseñan, modifican, preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como polipéptidos que se expresan con el uso de un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula huésped, polipéptidos aislados a partir de una biblioteca combinatoria de polipéptidos humanos recombinantes, (Hoogenboom H. R., (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., y Highsmith W. E., (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J. V., y Larrick J. W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H., y Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378), anticuerpos aislados a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulinas humanas (ver por ejemplo, Taylor, L. D., y otros (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., y Green L. L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. y otros (2000) Immunology Today 21:364-370) o polipéptidos que se preparan, expresan, crean o aíslan por cualquier otro medio que involucre el corte y empalme entre elementos de secuencia seleccionados. Uno o más de tales elementos de secuencia seleccionados pueden encontrarse en la naturaleza. Uno o más de tales elementos de secuencia seleccionados pueden diseñarse *in silico*. Uno o más de tales elementos de secuencia seleccionados pueden ser el resultado de la mutagénesis (por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*) de un elemento de secuencia conocido, por ejemplo, a partir de una fuente natural o sintética. Por ejemplo, un polipéptido recombinante puede comprender secuencias que se encuentran en el genoma de un organismo fuente de interés (por ejemplo, ser humano, ratón, etcétera). Un polipéptido recombinante puede tener una secuencia de aminoácidos que es el resultado de la mutagénesis (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo en un animal no humano), de manera que las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos recombinantes son secuencias que, aunque se originan de secuencias de polipéptidos y se relacionan con estas, pueden no existir naturalmente dentro del genoma de un animal no humano *in vivo*.

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

La frase "*factor activador de células B*" o "*BAFF*" o "*Baff*" como se usa en la presente se refiere a un ligando de la familia de necrosis tumoral, por ejemplo, un ligando de la familia de TNF. BAFF es una proteína unida a membrana de tipo II, que puede liberarse como un ligando soluble tras el procesamiento proteolítico en un sitio de escisión de furina. Las proteínas Baff pueden formar multímeros (por ejemplo, trímeros) en dependencia de las condiciones de

pH. Esta característica puede ser importante para la unión al receptor. BAFF se expresa en la superficie de una célula y sirve como una proteína reguladora involucrada en las interacciones entre proteínas de la superficie de la membrana en células inmunitarias, por ejemplo, células B. Diversas variantes, que incluyen las que son el resultado de eventos de corte y empalme alternativo, se han descrito en sujetos humanos así como en roedores. A modo de ilustración, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los genes *BAFF* humano y de ratón se proporcionan en la Tabla 3. Después de leer esta descripción los expertos reconocerán que uno o más genes *Baff* endógenos en un genoma (o todos) pueden reemplazarse con uno o más genes *Baff* heterólogos (por ejemplo, variantes polimórficas, subtipos o mutantes, genes de otras especies, formas humanizadas, etcétera).

Una "célula que expresa BAFF" como se usa en la presente se refiere a una célula que expresa un ligando factor activador de células B. Una célula que expresa BAFF puede expresar un ligando factor activador de células B en su superficie. Una proteína BAFF puede expresarse en la superficie de la célula en una cantidad suficiente para mediar las interacciones célula a célula por medio de la proteína BAFF expresada en la superficie de la célula. Una célula que expresa BAFF puede expresar un ligando factor activador de células B en forma soluble (es decir, no en la superficie de una célula). Las células que expresan BAFF ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, astrocitos, células dendríticas, monocitos, neutrófilos y células estromales. BAFF interactúa con receptores que se encuentran predominantemente en linajes de células B y está involucrada en la activación y supervivencia de células B. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden demostrar una regulación de las células inmunitarias por medio de ligandos *Baff* humanizados expresados en la superficie de una o más células del animal no humano. Los animales no humanos pueden promover la supervivencia a largo plazo de células B en animales no humanos que comprenden células madre hematopoyéticas heterólogas (por ejemplo, humanas). Los animales no humanos pueden promover la supervivencia a largo plazo de células B específicas de antígeno en animales no humanos que comprenden células madre hematopoyéticas heterólogas (por ejemplo, humanas).

El término "sustancialmente" como se usa en la presente se refiere a la condición cualitativa de exhibir una medida o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en la técnica biológica comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, o nunca, llegan a completarse y/o proceden a completar o lograr o evitar un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "sustancialmente" se usa en la presente descripción para capturar la carencia potencial de totalidad inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos.

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

Como se conoce bien en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos pueden compararse con el uso de cualquiera de una variedad de algoritmos, que incluyen los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para las secuencias de nucleótidos y BLASTP, gapped BLAST, y PSI-BLAST para las secuencias de aminoácidos. Los programas ilustrativos de este tipo se describen en Altschul, y otros, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, y otros, Methods in Enzymology; Altschul, y otros, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, y otros, Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, y otros, (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar las secuencias homólogas, los programas mencionados anteriormente típicamente proporcionan una indicación del grado de homología. Dos secuencias pueden considerarse sustancialmente homólogas si al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus residuos correspondientes son homólogos en un segmento relevante de residuos. El segmento relevante puede ser una secuencia completa. El segmento relevante puede ser de al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o más residuos. El segmento relevante puede incluir residuos contiguos a lo largo de una secuencia completa. El segmento relevante puede incluir residuos discontinuos a lo largo de una secuencia completa. El segmento relevante puede ser de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más residuos.

Tabla 1

Alanina	Ala	A	no polar	neutro	1,8
Arginina	Arg	R	polar	positivo	-4,5
Asparagina	Asn	N	polar	neutro	-3,5

ES 2 700 972 T3

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

Tabla 2

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

La frase "*identidad sustancial*" como se usa en la presente se refiere a una comparación entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la técnica, generalmente, dos secuencias se consideran "sustancialmente idénticas" si contienen residuos idénticos en las posiciones correspondientes. Como se conoce bien en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos pueden compararse con el uso de cualquiera de una variedad de algoritmos, que incluyen los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para las secuencias de nucleótidos y BLASTP, gapped BLAST, y PSI-BLAST para las secuencias de aminoácidos. Los programas ilustrativos de este tipo se describen en Altschul, y otros, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, y otros, Methods in Enzymology; Altschul y otros, Nucleic Acids

Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis y otros, *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; y Misener, y otros, (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132)*, Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente típicamente proporcionan una indicación del grado de identidad. Dos secuencias pueden considerarse sustancialmente idénticas si al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus residuos correspondientes son idénticos en un segmento relevante de residuos. El segmento relevante puede ser una secuencia completa. El segmento relevante puede ser de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más residuos.

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

El término "*variante*", como se usa en la presente, se refiere a una entidad que muestra una identidad estructural significativa con una entidad de referencia pero difiere estructuralmente de la entidad de referencia en la presencia o el nivel de una o más porciones químicas en comparación con la entidad de referencia. Una variante también puede diferir funcionalmente de su entidad de referencia. En general, el hecho de que una entidad particular se considere adecuadamente como una "variante" de una entidad de referencia se basa en su grado de identidad estructural con la entidad de referencia. Como apreciarán los expertos en la técnica, cualquier entidad de referencia biológica o química tiene determinados elementos estructurales característicos. Una variante, por definición, es una entidad química definida que comparte uno o más de tales elementos estructurales característicos. Para proporcionar algunos ejemplos, una molécula pequeña puede tener un elemento estructural central característico (por ejemplo, un macrociclo central) y/o una o más porciones colgantes características de manera que una variante de la molécula pequeña es una que comparte el elemento estructural central y las porciones colgantes características pero se diferencia en otras porciones colgantes y/o en los tipos de enlaces presentes (simples vs. dobles, E vs. Z, etcétera) dentro del núcleo central, un polipéptido puede tener un elemento de secuencia característico que comprende una pluralidad de aminoácidos que tienen posiciones designadas relacionadas entre sí en el espacio lineal o tridimensional y/o que contribuyen a una función biológica particular, un ácido nucleico puede tener un elemento de secuencia característico que comprende una pluralidad de residuos de nucleótidos que tienen posiciones designadas con respecto a otras en el espacio lineal o tridimensional. Por ejemplo, una variante de polipéptido puede diferir de un polipéptido de referencia como resultado de una o más diferencias en la secuencia de aminoácidos y/o una o más diferencias en las porciones químicas (por ejemplo, carbohidratos, lípidos, etcétera) unidas covalentemente a la cadena principal del polipéptido. Una variante de polipéptido puede mostrar una identidad de secuencia general con un polipéptido de referencia que es de al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, o 99 %. Alternativamente o adicionalmente, en algunos casos, una variante de polipéptido no comparte al menos un elemento de secuencia característico con un polipéptido de referencia. El polipéptido de referencia puede tener una o más actividades biológicas. Una variante de polipéptido puede compartir una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. Una variante de polipéptido puede carecer de una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. Una variante de polipéptido puede mostrar un nivel reducido de una o más actividades biológicas en comparación con el polipéptido de referencia. Un polipéptido de interés puede considerarse una "variante" de un polipéptido original o de referencia si el polipéptido de interés tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la del original excepto por un pequeño número de alteraciones de la secuencia en posiciones particulares. Típicamente, menos de 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, o 2 % de los residuos en la variante se encuentran sustituidos en comparación con el original. Una variante puede tener 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 residuo sustituido en comparación con un original. Frecuentemente, una variante tiene un número muy pequeño (por ejemplo, menos de 5, 4, 3, 2, o 1) de residuos funcionales sustituidos (es decir, residuos que participan en una actividad biológica particular). Además, típicamente, una variante no tiene más de 5, 4, 3, 2 o 1 adiciones o deleciones, y frecuentemente no tiene adiciones o deleciones, en comparación con el original. Por otra parte, cualquiera de las adiciones o deleciones son típicamente menores que aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 19, aproximadamente 18, aproximadamente 17, aproximadamente 16, aproximadamente 15, aproximadamente 14, aproximadamente 13, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, y comúnmente son menores que aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3, o aproximadamente 2 residuos. El polipéptido original o de referencia puede ser uno que se encuentra en la naturaleza. Como entenderán los expertos en la técnica, una pluralidad de variantes de un polipéptido de interés particular puede encontrarse comúnmente en la naturaleza, particularmente cuando el polipéptido de interés es un polipéptido agente infeccioso.

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

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

#### Descripción detallada de determinadas modalidades

En la presente se describen entre otras cosas, animales no humanos mejorados y/o modificados genéticamente que tienen material genético humanizado que codifica una proteína de factor activador de células B (por ejemplo, Baff). Tales animales no humanos pueden ser útiles, por ejemplo, para ensayos en injerto de trasplantes, activación de células B y supervivencia de células B específicas de antígeno posterior a la inmunización. Se contempla que tales animales no humanos proporcionan una mejora en la activación de células B y la supervivencia de células B específicas de antígeno posterior a la inmunización después del injerto de células madre hematopoyéticas humanas. Por lo tanto, la presente descripción es particularmente útil para mantener células hematopoyéticas humanas en animales no humanos. En particular, la presente descripción abarca la humanización de un gen *Baff* de roedor que da como resultado la expresión de una proteína humanizada en la superficie de la membrana plasmática de células del animal no humano. Tales proteínas humanizadas tienen la capacidad de reconocer células humanas injertadas por medio del acoplamiento de las proteínas Baff humanizadas y los ligandos/receptores presentes en la superficie de las células humanas injertadas. En la presente descripción se describe que los animales no humanos son capaces de recibir células hematopoyéticas humanas trasplantadas; tales mamíferos no humanos pueden desarrollar y/o tener un sistema inmunitario que comprende células humanas. Las proteínas Baff humanizadas pueden tener una secuencia codificada por los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano. Los animales no humanos descritos en la presente pueden comprender un gen *Baff* modificado genéticamente que contiene material genético del animal no humano y una especie heteróloga (por ejemplo, un ser humano). Los animales no humanos como se describe en la presente pueden comprender un gen *Baff* humanizado, en donde el gen *Baff* humanizado comprende los exones 3, 4, 5 y 6 de un gen *BAFF* humano. La expresión de la proteína Baff humanizada puede estar bajo el control de material genético de *Baff* no humano (por ejemplo, un promotor de *Baff* no humano).

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

#### 35 *Gen del factor activador de células B (BAFF)*

El factor activador de células B (BAFF o Baff) es un miembro de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral (TNF) y se expresa en muchos tipos de células diferentes que incluyen, pero no se limitan a, astrocitos, células del linaje de células B, células dendríticas, monocitos, neutrófilos y células estromales. BAFF (también denominado miembro 13C de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral, TNFSF13C, BAFF, BLYS, CD257, DTL, TALL-1, TALL1, THANK, TNFSF20 y ZTNF4) se expresa en la superficie celular como una proteína transmembrana de tipo II y puede liberarse en forma soluble por medio de la escisión en un sitio consenso de furina después de la proteólisis. La BAFF soluble puede existir en múltiples formas (por ejemplo, trímeros, 60-meros) en dependencia del pH. La estructura del gen para BAFF en ratón y en el hombre puede diferir ligeramente en el hecho de que el primero contiene un exón adicional. En seres humanos, el exón 1 codifica el dominio transmembrana, el exón 2 codifica el sitio de escisión de furina, y los exones 3 a 6 codifican el dominio TNF, que es responsable de la unión al receptor. En ratón, el exón 1 codifica el dominio transmembrana, el exón 2 codifica el sitio de escisión de furina, el exón 3 codifica aminoácidos adicionales entre el sitio de furina y el dominio TNF, y los exones 4-7 codifican el dominio TNF. Tanto para ratón como para el hombre, las variantes de corte y empalme alternativo dan como resultado una delección de una porción interna de la proteína que produce una variante denominada "delta-BAFF" (o  $\Delta$ BAFF). En seres humanos, se omite el exón 3, mientras que en ratón se omite el exón 4.  $\Delta$ BAFF aún se expresa en la superficie celular, sin embargo, según se informa la liberación de la forma soluble se impide. Los receptores informados para BAFF incluyen, de manera más notable, el receptor de BAFF (BAFF-R), pero también incluyen el ligando de interacción de ciclofilina, activador transmembrana y modulador de calcio (TACI) y antígeno de maduración de células B (BCMA). BAFF se une a BAFF-R y TACI con afinidad fuerte, mientras que BAFF se une a BCMA con afinidad débil.

El papel de Baff, en particular, se ha investigado con respecto a su papel en la activación y diferenciación de células B. Por ejemplo, se descubrió que niveles elevados de Baff en ratones transgénicos que sobreexpresan Baff de ratón promueven la supervivencia, la tolerancia y el rescate de células B con afinidad por autoantígenos lo que promueve de este modo la secreción de autoanticuerpos (Ota y otros, 2010, J. Immunol. 185:4128-4136).

#### *Secuencias de BAFF*

En la Tabla 3 se exponen secuencias ilustrativas de BAFF para ser humano y ratón. Para las secuencias de ADNc, los exones consecutivos están separados por texto subrayado alternante. Para las secuencias de proteína, las regiones transmembrana predichas están subrayadas.

Tabla 3

5	<b>ADNc de <i>Baff</i> de ratón</b> <b>NM_033622,1</b>	<u>GGCACGAGGCAGATTGAGCAATCCATGGAAGGCCAGAGCCAGAGAA</u> <u>CCTACTTCAGGGTAGCAAAAGATGCAGAAGAAAGTCAGGAGAGCGC</u> <u>TCCTGGGGGAACCCAGCCCTGCCATGCTCTGAGGGCAGTCTCCAG</u> <u>GACACAGATGACAGGAAATGACCCACCCCTGTGGTCACTTACTCCA</u> <u>AAGGCCTAGACCTTCAAAGTGCTCCTCGTGGAAATGGATGAGTCTGC</u> <u>AAAGACCCTGCCACCACCGTGCCTCTGTTTTGCTCCGAGAAAGGA</u> <u>GAAGATATGAAAGTGGGATATGATCCCATCACTCCGAGAAGGAGG</u> <u>AGGGTGCCTGGTTTTGGGATCTGCAGGGATGGAAGGCTGCTGGCTGC</u> <u>TACCCTCCTGCTGGCCCTGTTGTCCAGCAGTTTCACAGCGATGTCC</u> <u>TTGTACCAGTTGGCTGCCTTGCAAGCAGACCTGATGAACCTGCGCA</u> <u>TGGAGCTGCAGAGCTACCGAGGTTCAAGCAACACCAGCCGCCGCGGG</u> <u>TGCTCCAGAGTTGACCGCTGGAGTCAAACCTCCTGACACCGGCAGCT</u> <u>CCTCGACCCCAACTCCAGCCGCGGCCACAGGAACAGACGCGCTT</u> <u>TCCAGGGACCAGAGGAAACAGAACAAGATGTAGACCTCTCAGCTCC</u> <u>TCCTGCACCATGCCTGCCTGGATGCCGCCATTCTCAACATGATGAT</u> <u>AATGGAATGAACCTCAGAAACATCATTCAAGACTGTCTGCAGCTGA</u> <u>TTGCAGACAGCGACACGCCGACTATACGAAAAGAACTTACACATT</u> <u>TGTTCCATGGCTTCTCAGCTTTAAAAGAGGAAATGCCTTGGAGGAG</u> <u>AAAGAGAAACAAAATAGTGGTGGAGGCAACAGGCTATTTCTTCATCT</u> <u>ACAGCCAGGTTCTATACACGGACCCCATCTTTGCTATGGGTGATGT</u> <u>CATCCAGAGGAAGAAAGTACACGTCTTTGGGACGAGCTGAGCCTG</u> <u>GTGACCCTGTTCCGATGTATTCAGAATATGCCCAAAACACTGCCCA</u> <u>ACAATTCTGCTACTCGGCTGGCATCGCGAGGCTGGAAGAAGGAGA</u> <u>TGAGATTGAGCTTGCAATTCCTCGGGAGAATGCACAGATTTACAGC</u> <u>AACGGAGACGACACCTTCTTTGGTGGCCATAAACTGCTGTAACCTCA</u> <u>CTTGCTGGAGTGCCTGATCCCCTTCCCTCGTCTTCTCTGTACCTCC</u> <u>GAGGGAGAAACAGACGACTGGAAAAACTAAAAGATGGGGAAAGCCG</u> <u>TCAGCGAAAGTTTTCTCGTGACCCGTTGAATCTGATCCAAACCAGG</u> <u>AAATATAACAGACAGCCACAACCGAAGTGTGCCATGTGAGTTATGA</u> <u>GAAACGGAGCCCGCGCTCAGAAAGACCGGATGAGGAAGACCGTTTT</u> <u>CTCCAGTCCTTTGCCAACACGCACCGCAACCTTGCTTTTTGCCTTG</u> <u>GGTGACACATGTTTCAAGATGCAGGGAGATTTCTTGTGTTTTGCGATT</u> <u>TGCCATGAGAAGAGGGCCCAACTGCAGGTCAGTGAAGCATTAC</u> <u>GCTAAGTCTCAGGATTTACTCTCCCTTCTCATGCTAAGTACACACA</u> <u>CGCTCTTTTCCAGGTAATACTATGGGATACTATGGAAGGTTGTTTT</u> <u>GTTTTTAAATCTAGAAGTCTTGAAGTGGCAATAGACAAAAATCCTT</u> <u>ATAAATCAAGTGTAAAATAAACTTAATAAAAAGGTTTAAGTGTG</u> <u>AAAAAAA (SEQ ID NO: 1)</u>
10		
15		
20		
25		
30	<b>Proteína <i>Baff</i> de ratón</b> <b>NP_296371,1</b>	<u>MDESAKTLPPPCLFCFCSEKGEDMKVGYDPITPQKEEGAWFGICRDG</u> <u>RLLAATLLLLALLSSSFTAMSLYQLAALQADLMNLRMELQSYRGSAT</u> <u>PAAAGAPELTAGVKLLTPAAPRPHNSSRGHRNRRAFQGPETEQDV</u> <u>DLSAPPAPCLPGCRHSQHDDNGMNLRNI IQDCLQLIADSDTPTIRK</u> <u>GTYTFVPWLLSFKRGNAL EEKENKIVVRQTGYFFIYSQVLYTDPIF</u>
35		<u>AMGHVIQRKKVHVFGEDELSLVTLFRCIQNMPKTLPNNSCYSAGIAR</u> <u>LEEGDEIQLAIPRENAQISRNGDDTFFGALKLL (SEQ ID NO: 2)</u>

ES 2 700 972 T3

5	<p><b>Proteína ΔBaff de ratón AY290823,1</b></p>	<p>MDESAKTLPPPCLCFCSEKGEDMKVGYDPI TPQKEEGAWFGICRDG          RLLAATLLLALLSSSFTAMSLYQLAALQADLMNLRMELQSYRGSAT          PAAAGAPELTAGVKLLTPAAPRPHNSSRGHRNRRAFQGPETE QDV          DLSAPPAPCLPGCRHSQHDDNGMNLNRNTYTFVPWLLSFKRGNAL E          EKENKIVVRQTGYFFIYSQVLYTDPI FAMGHVIQRKKVHVFGDELS          LVTLFRCIQNMPKTLPNNSCY SAGIARLEEGDEIQ LAIPRENAQIS          RNGDDTFFGALKLL (SEQ ID NO: 3)</p>
<p>10</p> <p>15</p> <p>20</p> <p>25</p> <p>30</p>	<p><b>ADNc de BAFF humano NM_006573,4</b></p>	<p>GAAATTCTTACAAAACTGAAAGTGAAATGAGGAAGACAGATTGAG          CAATCCAATCGGAGGGTAAATGCCAGCAAACCTACTGTACAGTAGG          GGTAGAGATGCAGAAAGGCAGAAAGGAGAAAAATTCAGGATAACTCT          CCTGAGGGGTGAGCCAAGCCCTGCCATGTAGTGCACGCAGGACATC          AACAAACACAGATAACAGGAAATGATCCATTCCCTGTGGTCACTTA          TTCTAAAGGCCCAACCTTCAAAGTTCAAGTAGTGATATGGATGAC          TCCACAGAAAGGGAGCAGTCACGCCTTACTTCTTGCCTTAAGAAAA          GAGAAGAAATGAAACTGAAGGAGTGTGTTTCCATCTCCACGGAA          GGAAAGCCCTCTGTCCGATCCTCCAAAGACGGAAAGCTGCTGGCT          GCAACCTTGCTGCTGGCACTGCTGTCTTGCTGCCTCACGGTGGTGT          CTTTCTACCAGGTGGCCGCCCTGCAAGGGGACCTGGCCAGCCTCCG          GGCAGAGCTGCAGGGCCACCACGCGGAGAAGCTGCCAGCAGGAGCA          GGAGCCCCAAGGCCGGCCTGGAGGAAGCTCCAGCTGTCAACCGCG          GACTGAAAATCTTTGAACCACCAGCTCCAGGAGAAGGCAACTCCAG  <u>TCAGAACAGCAGAAAATAAGCGTGCCGTTCCAGGGTCCAGAAAGAAACA</u>  <u>GTCACTCAAGACTGCTTGCAACTGATTGCAGACAGTGAAACACCAA</u>  <u>CTATACAAAAAGGATCTTACACATTTGTTCCATGGCTTCTCAGCTT</u>  <u>TAAAAGGGGAAGTGCCCTAGAAGAAAAAGAGAATAAAATATTGGTC</u>  <u>AAAGAACTGGTTACTTTTTTATATATGGTCAGTTTTATATACTG</u>  <u>ATAAGACCTACGCCATGGGACATCTAATTCAGAGGAAGAAGGTCCA</u>  <u>TGTCCTTGGGGATGAATTGAGTCTGGTGACTTTGTTTCGATGTATT</u>  <u>CAAAATATGCCTGAAACACTACCCAATAATTCCTGCTATTTCAGCTG</u>  <u>GCATTGCAAAACTGGAAGAAGGAGATGAACTCCAATTCGAATACC</u>  <u>AAGAGAAAATGCACAAATATCACTGGATGGAGATGCACATTTTTT</u>  <u>GGTGCAATTGAAACTGCTGTGACCTACTTACACCATGTCTGTAGCTA</u>  <u>TTTTCTCCCTTTCTCTGTACCTCTAAGAAGAAAGAACTAACTGA</u>  <u>AAATACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTAGTTAC</u>  <u>CATTGCCTTTTCTGTGAGCTATTTGTTTTGGTTTGTGAAACTAGT</u>  <u>CCAAAACAGGAAATTTAACAGACAGCCACAGCCAAAGAGTGT CATG</u>  <u>TGAATTACAAGAAATAGAGGCCATTTAGGGAAAGATAGA ACTAGAA</u>  <u>AGGCTTTTCATTATAATTCATGTTGAACAATTGAGTCATAGCTTC</u>  <u>TATCTTGGAGGAAGGACACAATTCAAAGGGGCAGTAAGGATTTTG</u>  <u>TAAAACGTGGCATCCATAATTTACTATGGAGCAAGTGCCACATCT</u>  <u>CTAGGACATTAAGACATTTATGAGAAATCTCAGGATTCATCTTCTG</u>  <u>TTTTTATGTTAAATGCACTCCCTCCTTTTCAGTTAACATTATAAAA</u>  <u>AGTAAAAAATGAAAATTTTAGAAATCTTGCATTAGACACATGAAAA</u>  <u>AATAACTAAAAGTTTAAATTTAAATATGAAACAATTTTGCTGAAAA</u>  <u>TAGTATCCATATACTATTTAAGTCTTTTATGGTTATTTCAAGTATA</u>  <u>CAATTTCTATCTGTAATGTAATATATTACCCACACATTTTTTTTCAC</u>  <u>AGGAGAGAGAGAATATCCTCATTGTTTATGCTCATGTGTATTTTC</u>  <u>TATAGTGAATTCAGAACTTTTAAATATCAGGTAATTTCAATTTAT</u>  <u>GCCTATAAAGCATTGATTGAAAAATAACTAGAATTTGTGCATATATA</u>  <u>ACACATAATCTCCAACAGAAGTTACTGAATACATTCATACTAATGT</u></p>

5		<p>AATGTAATTTCCCTTTATTTCTTGCTCTTCTGTTTCAAACCTGCTGC  TATTGTAGTTTACATATCCCAACCTTTAAAAATATTCCTCTTATTA  GCTTTATATTCACTTTATAGAAAGTTGAGTTTTAATTAATAATCTTG  GCATCCTGAAGTATGTCACATAGCATGTGCTCCTTATAAATATGTT  GATATCTCAGAAGACAGCATCCCGGTTTTTCATTTTATAAAGTACCA  TACTTAAGAATGCTGTAATACTTATCTTTTATAACATGTTTCCTTC  GCTTTGCTTGTCTTTTATGTCATCAGTTTTAACTGTTTACTTCATT  TAACAGTTTACATCATTCAACAGTTTACTTCATTAACAGTAGGTG  GAAAAATAGATGCCAGTCTATGAAAAATCTTCCCATCTATATCAAAA  TACTTTTCAAGGATATACTTTTCAAAAACAAACGATTTAAATTTTAT  GTTTAAAAATAAACTTTAGATTTAACTTTATTTAAATATCTGGT  TCCTATGATTTTGACTTCAGTAAGTTCAAATAAAATATATTTGCA  ATTCATTTTACATTATAATTTAAAAAGAAGAAGCGATAAGTGGAG  TCAGTTTCAATGCTAGGTGGGGTGGTTAATGATTTTTCTGGTGTG  CTGCTAATGTGGATTAACAAATAAAAAACATTCATTGCCTTTTGCC  CATAAAA (SEQ ID NO: 4)</p>
10		
15	<b>Proteína BAFF humana NP_006564,1</b>	<p>MDDSTEREQSRLTSCLKKREEMKLKECVSILPRKESPSVRSSKDGK  LLAATLLLALLSCCLTVVSFYQVAALQGDLASLRAELQGHHAEKLP  AGAGAPKAGLEEAPAVTAGLKI FEPPAPGEGNSSQNSRNKRAVQGP  EETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSAL EEKENK  ILVKETGYFFIYGQVLYTDKTYAMGHLIQRKKVHVFGDELSLVTLF  RCIQNMPETLPNNSCYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDV  TFFGALKLL (SEQ ID NO: 5)</p>
20	<b>Proteína ΔBAFF humana AY302751,1</b>	<p>MDDSTEREQSRLTSCLKKREEMKLKECVSILPRKESPSVRSSKDGK  LLAATLLLALLSCCLTVVSFYQVAALQGDLASLRAELQGHHAEKLP  AGAGAPKAGLEEAPAVTAGLKI FEPPAPGEGNSSQNSRNKRAVQGP  EETGSYTFVPWLLSFKRGSAL EEKENKI LVKETGYFFIYGQVLYTD  KTYAMGHLIQRKKVHVFGDELSLVTLFRCIQNMPETLPNNSCYSAG  IAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALKLL (SEQ ID  NO: 6)</p>
25	<b>Proteína humanizada BAFF</b>	<p>MDESAKTLPPCLCFCSEKGEDMKVGYDPI TPQKEEGAWFGICRDG  RLAATLLLALLSSSFTAMSLYQLAALQADLMNLRMELQSYRGSAT  PAAAGAPELTAGVKLLTPAAPRPHNSSRGRNRRAFQGP EETVTQD  CLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSAL EEKENKI LVKETG  YFFIYGQVLYTDKTYAMGHLIQRKKVHVFGDELSLVTLFRCIQNMP  ETLPNNSCYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALK  LL (SEQ ID NO: 7)</p>

Animales no humanos con BAFF humanizada

Se proporcionan animales no humanos que expresan proteínas BAFF modificadas genéticamente (por ejemplo, humanizadas) en la superficie de células (por ejemplo, células dendríticas) de los animales no humanos. Específicamente, en la presente se describen animales no humanos que expresan proteínas BAFF modificadas genéticamente (por ejemplo, humanizadas) en la superficie de sus células, las proteínas se codifican por y/o se expresan a partir de la modificación genética de un locus endógeno del animal no humano que codifica una proteína BAFF. Los ejemplos adecuados que se presentan en la presente ejemplifican específicamente roedores, en particular, ratones.

Un gen *BAFF* modificado genéticamente puede comprender material genético de una especie heteróloga (por ejemplo, seres humanos), en donde el gen *BAFF* modificado genéticamente codifica una proteína BAFF que comprende la porción codificada del material genético de la especie heteróloga. Un gen *BAFF* modificado genéticamente como se describe en la presente puede comprender ADN genómico de una especie heteróloga que corresponde a la porción extracelular de una proteína BAFF que se expresa en la membrana plasmática de una célula. Se proporcionan además animales no humanos, embriones, células y constructos de transformación para producir animales no humanos, embriones no humanos, y células que contienen dicho gen *BAFF* modificado genéticamente.

- 5 El gen *Baff* endógeno puede eliminarse. El gen *Baff* endógeno puede alterarse, en donde una porción del gen *Baff* endógeno se reemplaza con una secuencia heteróloga (por ejemplo, una secuencia del gen *BAFF* humano, en su totalidad o en parte). La totalidad o sustancialmente la totalidad del gen *Baff* endógeno puede reemplazarse con un gen heterólogo (por ejemplo, un gen *BAFF* humano). Una porción de un gen *Baff* heterólogo puede insertarse en un gen *Baff* endógeno no humano. El gen heterólogo puede ser un gen humano.
- 10 Un animal no humano como se describe en la presente puede contener un gen *BAFF* humano, en su totalidad o en parte, en un locus *Baff* endógeno no humano. Por lo tanto, tales animales no humanos pueden describirse como que tienen un gen *Baff* humanizado. El gen *Baff* endógeno reemplazado, insertado o modificado (es decir, el gen *Baff* humanizado) puede detectarse con el uso de una variedad de métodos que incluyen, por ejemplo, PCR, transferencia Western, transferencia Southern, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), o un ensayo de ganancia o pérdida de alelos.
- 15 Un gen *Baff* humanizado puede incluir un gen *Baff* que tiene un tercer, cuarto, quinto, y sexto exón cada uno con una secuencia al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a un tercer, cuarto, quinto, y sexto exón que aparece en un gen *BAFF* humano de la Tabla 3.
- 20 Un gen *Baff* humanizado como se describe en la presente puede incluir un gen *Baff* que tiene una secuencia codificante de nucleótidos (por ejemplo, una secuencia de ADNc) al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a los nucleótidos 692 – 2 671 que aparecen en una secuencia de ADNc de *BAFF* humano de la Tabla 3.
- 25 Una proteína Baff humanizada producida por un animal no humano como se describe en la presente puede tener una porción extracelular que tiene una secuencia que es al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una porción extracelular de una proteína *BAFF* humana que aparece en la Tabla 3.
- 30 Una proteína Baff humanizada producida por un animal no humano como se describe en la presente puede tener una porción extracelular que tiene una secuencia que es al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a los residuos de aminoácidos 142 a 285 que aparecen en una proteína *BAFF* humana de la Tabla 3.
- 35 Una proteína Baff humanizada producida por un animal no humano como se describe en la presente puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una secuencia de aminoácidos de una proteína Baff humanizada que aparece en la Tabla 3.
- 40 Una proteína Baff humanizada producida por un animal no humano como se describe en la presente puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una secuencia de aminoácidos de una proteína *BAFF* humana que aparece en la Tabla 3.
- 45 Se proporcionan composiciones y métodos para producir animales no humanos que expresan una proteína Baff humanizada, que incluye formas polimórficas específicas o variantes alélicas (por ejemplo, diferencias en un solo aminoácido, variantes de corte y empalme alternativo, etcétera), que incluyen composiciones y métodos para producir animales no humanos que expresan tales proteínas a partir de un promotor humano y una secuencia reguladora humana u, opcionalmente, a partir de un promotor no humano y una secuencia reguladora no humana. Se describen además composiciones y métodos para producir animales no humanos que expresan tales proteínas a partir de un promotor endógeno y una secuencia reguladora endógena. Los métodos incluyen insertar el material genético que codifica una proteína *BAFF* humana, en su totalidad o en parte, en una ubicación precisa en el genoma de un animal no humano que corresponde a un gen *Baff* endógeno para crear de este modo un gen *Baff* humanizado que expresa una proteína Baff que es humana, en su totalidad o en parte. Los métodos pueden incluir insertar ADN genómico correspondiente a los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano en un gen *Baff* endógeno del animal no humano para crear de este modo un gen humanizado que codifica una proteína Baff que contiene una porción humana que contiene aminoácidos codificados por los exones insertados.
- 50 Un enfoque de gen *Baff* humanizado puede emplear una modificación relativamente mínima del gen endógeno y puede dar como resultado la transducción de señales natural mediada por Baff en el animal no humano dado que la secuencia genómica del gen *Baff* puede modificarse en un solo fragmento y por lo tanto mantener la funcionalidad normal mediante la inclusión de las secuencias reguladoras necesarias. Por lo tanto, en tales casos, la modificación del gen *Baff* no afecta a otros genes cercanos u otros genes *Baff* endógenos. Además, la modificación puede no afectar el ensamblaje de una proteína transmembrana funcional en la membrana plasmática y mantiene la asociación normal con sus receptores por medio de la unión e interacción de la porción extracelular con un receptor determinado que no se afecta por la modificación.
- 55

Una ilustración esquemática (no a escala) de los genes *BAFF* endógenos murino y humano se proporciona en la Figura 1. Una ilustración esquemática (no a escala) de un gen *Baff* humanizado se proporciona en la Figura 2. Como se ilustra, el ADN genómico que contiene los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano se inserta en un locus de un gen *Baff* endógeno murino mediante un constructo de transformación. Este ADN genómico comprende la porción del gen que codifica la porción extracelular (por ejemplo, los residuos de aminoácidos 142 a 285) de una proteína BAFF humana responsable de la unión al receptor.

Un animal no humano (por ejemplo, un ratón) que tiene un gen *Baff* humanizado puede producirse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede producirse un vector de transformación que introduce un gen *BAFF* humano, en su totalidad o en parte, con un gen marcador de selección. La Figura 2 ilustra un genoma de ratón que comprende una inserción de los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano. Como se ilustra, el constructo de transformación contiene sitios de endonucleasas de restricción únicos en 5' y 3' lo que permite la inserción precisa del material genético humano que comprende los exones 3 a 6 de un gen *Baff* humano. El constructo de transformación contiene además un casete de selección por fármaco autoeliminable (por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina flanqueado a ambos lados por secuencias *LoxP*; ver las patentes US 8,354,389 y US 8,518,392), que se posiciona en 3' del material genético que comprende los exones 3 a 6 de un gen *Baff* humano. Tras la digestión y religación, los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano se insertan en un gen *Baff* endógeno murino que se ha modificado genéticamente específicamente para aceptar la secuencia humana contenida en el vector de transformación. Se crea un gen *Baff* humanizado lo que da como resultado una célula o animal no humano que expresa una proteína *Baff* humanizada que contiene los aminoácidos codificados por los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano. El casete de selección por fármaco se eliminará de una manera dependiente del desarrollo, es decir, la progenie derivada de los ratones cuyas células de la línea germinal contienen el gen *Baff* humanizado descrito anteriormente liberarán el marcador de selección de las células diferenciadas durante el desarrollo.

Los animales no humanos como se describen en la presente pueden prepararse como se describió anteriormente, o mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, para comprender genes humanos o humanizados adicionales, lo que depende frecuentemente del uso deseado del animal no humano. El material genético de tales genes humanos o humanizados adicionales puede introducirse a través de otra alteración del genoma de las células (por ejemplo, células madre embrionarias) que tienen las modificaciones genéticas como se describió anteriormente o a través de técnicas de cruzamiento conocidas en la técnica con otras cepas modificadas genéticamente según sea conveniente. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden prepararse de modo que comprendan además uno o más genes humanos o humanizados seleccionados de *BAFF-R*, *TACI*, y *BCMA*. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden prepararse de modo que comprendan además un gen de ligando inductor de la proliferación (*AProliferation-Inducing Ligand*, *APRIL*) humano o humanizado. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden prepararse de modo que comprendan además un inductor débil de apoptosis relacionado con TNF (*TWEAK*) humano o humanizado. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden comprender un gen *Baff* humanizado como se describe en la presente y material genético de una especie heteróloga (por ejemplo, seres humanos), en donde el material genético codifica, en su totalidad o en parte, una o más proteínas heterólogas seleccionadas de *BAFF-R*, *TACI*, *BCMA*, *APRIL* y *TWEAK*.

Además de ratones que tienen genes *Baff* humanizados como se describe en la presente, en la presente se describen además otros animales no humanos modificados genéticamente que comprenden genes *Baff* humanizados. Tales animales no humanos pueden comprender un gen *Baff* humanizado unido operativamente a una secuencia promotora de *Baff* endógeno. Tales animales no humanos pueden expresar una proteína BAFF humanizada a partir de un locus *Baff* endógeno, en donde la proteína *Baff* humanizada comprende los residuos de aminoácidos 142 a 285 de una proteína BAFF humana.

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

Un animal no humano como se describe en la presente puede ser un mamífero. Un animal no humano como se describe en la presente puede ser un mamífero pequeño, por ejemplo, de la superfamilia Dipodoidea o Muroidea. Un animal modificado genéticamente como se describe en la presente puede ser un roedor. Un roedor como se describe en la presente puede seleccionarse de un ratón, una rata, y un hámster. Un roedor como se describe en la presente puede seleccionarse de la superfamilia Muroidea. Un animal modificado genéticamente como se describe en la presente puede ser de una familia seleccionada de Calomyscidae (por ejemplo, hámsteres similares a ratón), Cricetidae (por ejemplo, hámster, ratas y ratones del Nuevo Mundo, ratones campestres), Muridae (ratones y ratas verdaderos, jerbos, ratones espinosos, ratas crestadas), Nesomyidae (ratones trepadores, ratones de roca, ratas coliblancas, ratas y ratones de Madagascar), Platacanthomyidae (por ejemplo, lirones espinosos), y Spalacidae (por

ejemplo, ratas topo, ratas de bambú, y zokores). Un roedor modificado genéticamente como se describe en la presente puede seleccionarse de un ratón o una rata verdaderos (familia Muridae), un jerbo, un ratón espinoso, y una rata crestada. Un ratón modificado genéticamente como se describe en la presente puede ser un miembro de la familia Muridae. Un animal no humano como se describe en la presente puede ser un roedor. Un roedor como se describe en la presente puede seleccionarse de un ratón y una rata. Un animal no humano como se describe en la presente puede ser un ratón.

Un animal no humano como se describe en la presente puede ser un roedor que es un ratón de una cepa C57BL seleccionada de C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, y C57BL/Ola. Un ratón como se describe en la presente puede ser de una cepa 129 seleccionada del grupo que consiste en una cepa que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129/SvJae, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (ver, por ejemplo, Festing y otros, 1999, Mammalian Genome 10:836; Auerbach y otros, 2000, Biotechniques 29(5):1024-1028, 1030, 1032). Un ratón modificado genéticamente como se describe en la presente puede ser una mezcla de una cepa 129 mencionada anteriormente y una cepa C57BL/6 mencionada anteriormente. Un ratón como se describe en la presente puede ser una mezcla de las cepas 129 mencionadas anteriormente, o una mezcla de las cepas BL/6 mencionadas anteriormente. La cepa 129 de la mezcla como se describe en la presente es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). Un ratón como se describe en la presente puede ser una cepa BALB, por ejemplo, la cepa BALB/c. Un ratón como se describe en la presente puede ser una mezcla de una cepa BALB y otra cepa mencionada anteriormente.

Un animal no humano como se describe en la presente puede ser una rata. Una rata como se describe en la presente puede seleccionarse de una rata Wistar, una cepa LEA, una cepa Sprague Dawley, una cepa Fischer, F344, F6, y Dark Agouti. Una cepa de rata como se describe en la presente es una mezcla de dos o más cepas seleccionadas del grupo que consiste en Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6, y Dark Agouti.

Métodos que emplean animales no humanos que tienen genes BAFF humanizados

Se han informado animales no humanos (por ejemplo, ratones) transgénicos para Baff (Mackay y otros, 1999, J. Exp. Med. 190(11):1697-1710; Khare y otros, 2000, PNAS 97(7):3370-3375; Gavin y otros, 2005, J. Immunol. 175:319-328). Tales animales se han empleado en una variedad de ensayos para determinar los aspectos moleculares de la expresión, función y regulación de BAFF. Sin embargo, no lo han sido sin limitación. Por ejemplo, el uso de ratones transgénicos para Baff ha sido limitado debido a la sobreexpresión de Baff murina (por ejemplo, Baff o ΔBaff de longitud completa). La sobreexpresión de Baff en ratones transgénicos conduce a varias anomalías de células B caracterizadas por, entre otras, la acumulación y activación excesivas de células B, y enfermedad autoinmunitaria por proliferación de células B autorreactivas. En algunos casos, los ratones transgénicos que sobreexpresan BAFF murina tienen niveles de inmunoglobulina sérica (por ejemplo, IgM, IgG, IgE, etcétera) aumentados. Además, los ratones transgénicos que sobreexpresan Baff murina demuestran otras anomalías tales como glomerulonefritis. Por lo tanto, los aspectos moleculares de la función biológica y las rutas de señalización mediadas por BAFF no se han explotado en ratones transgénicos.

Los animales no humanos como se describe en la presente pueden proporcionar un sistema *in vivo* mejorado y una fuente de materiales biológicos (por ejemplo, células) que expresan BAFF humana los cuales son útiles para una variedad de ensayos. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse para desarrollar productos terapéuticos que se dirigen a BAFF humana y/o modular las vías de señalización mediadas por BAFF. Los ratones como se describe en la presente pueden usarse para seleccionar y desarrollar productos terapéuticos candidatos (por ejemplo, anticuerpos) que se unen a BAFF humana. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse para determinar el perfil de unión de antagonistas y/o agonistas de una Baff humanizada en la superficie de una célula de un animal no humano como se describe en la presente.

Los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse para medir el efecto terapéutico de bloquear o modular la transducción de señales de BAFF humana (por ejemplo, fosforilación) y el efecto sobre la expresión génica como resultado de cambios celulares. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse para medir el efecto terapéutico de bloquear o modular las vías de señalización de BAFF-BAFFR, BAFF-TACI, y/o BAFF-BCMA humanos, por ejemplo, la modulación de la transcripción del ADN mediada por NF-κB. Un animal no humano como se describe en la presente o células aisladas de este pueden exponerse a un producto terapéutico candidato que se une a una proteína BAFF humana en la superficie de una célula del animal no humano y, después de un período de tiempo posterior, analizarse en cuanto a los efectos sobre los procesos dependientes de BAFF, por ejemplo, la activación de células B, la regulación de las cantidades de subconjuntos específicos de células B en diversos compartimentos (por ejemplo, bazo, médula ósea, ganglio linfático, etcétera), la supervivencia de células B autorreactivas, y la activación de NF-κB.

Los animales no humanos como se describe en la presente pueden expresar proteína Baff humanizada, por lo tanto pueden generarse células, líneas celulares, y cultivos de células de modo que sirvan como fuente de Baff humanizada para usar en ensayos de unión y funcionales, por ejemplo, para ensayar la unión o función de un antagonista o un agonista de BAFF, particularmente cuando el antagonista o el agonista es específico para una secuencia o epítipo de BAFF humana. Una proteína Baff humanizada expresada en un animal no humano como se describe en la presente

5 puede comprender una variante de la secuencia de aminoácidos. Se han informado variantes de proteínas BAFF humanas que tienen variaciones asociadas con los residuos de unión al ligando. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden expresar una variante de proteína Baff humanizada. La variante puede ser polimórfica en una posición de un aminoácido asociado con la unión al ligando. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse para determinar el efecto de la unión al ligando a través de la interacción con una variante polimórfica de BAFF humana. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden expresar una variante de corte y empalme de la proteína BAFF humana que aparece en la Tabla 3.

10 Las células de los animales no humanos como se describen en la presente descripción, pueden aislarse y usarse con base a fines específicos, o pueden mantenerse en cultivo por muchas generaciones. Por ejemplo, las células de animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse en una variedad de ensayos celulares conocidos en la técnica. Las células de un animal no humano como se describe en la presente pueden immortalizarse y mantenerse en cultivo indefinidamente (por ejemplo, en cultivos en serie).

15 Las células y/o los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse en un ensayo de supervivencia y/o proliferación (por ejemplo, con el empleo de células T o B) para seleccionar y desarrollar productos terapéuticos candidatos que modulan BAFF humana. La supervivencia de células B autorreactivas desempeña un papel importante en la patología crónica de enfermedades autoinmunitarias, tales como, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (SLE), por lo tanto, los moduladores de BAFF candidatos (por ejemplo, antagonistas) pueden identificarse, caracterizarse y desarrollar con el uso de células de animales no humanos como se describe en la presente y/o un animal no humano como se describe en la presente. Las células y/o los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse en un ensayo de supervivencia para determinar la cantidad de células B plasmáticas específicas de antígeno en presencia y ausencia de BAFF.

25 Las células y/o los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse en diversos regímenes de inmunización para determinar las funciones mediadas por BAFF en la respuesta inmunitaria a un antígeno. Los productos terapéuticos candidatos que se unen, o bloquean una o más funciones de, BAFF humana pueden caracterizarse en un animal no humano como se describe en la presente. Las mediciones adecuadas incluyen diversos ensayos celulares, ensayos de proliferación, análisis de inmunoglobulinas séricas (por ejemplo, titulación de anticuerpos), ensayos de citotoxicidad, caracterización de las interacciones entre ligando y receptor (ensayos de inmunoprecipitación). Los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse para caracterizar las funciones mediadas por BAFF que regulan una respuesta inmunitaria a un antígeno. El antígeno puede asociarse con una enfermedad o afección autoinmunitaria. El antígeno puede ser un antígeno de prueba (por ejemplo, ovalbúmina u OVA). El antígeno puede ser una diana asociada con una enfermedad o afección que padecen uno o más pacientes humanos que necesitan tratamiento.

35 Los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse en ensayos del suero para determinar los títulos de la producción de autoanticuerpos contra ADN bicatenario (ADNbc) para evaluar los aspectos farmacotológicos de los productos terapéuticos candidatos que se dirigen a BAFF humana. La producción de autoanticuerpos contra ADN bicatenario (ADNbc) en los animales no humanos como se describe en la presente puede ser el resultado de una o más enfermedades o afecciones autoinmunitarias inducidas en el animal no humano.

40 Las células y/o animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse para caracterizar el repertorio y/o la especificidad de los anticuerpos generados en una respuesta inmunitaria al antígeno. La respuesta inmunitaria puede caracterizarse por la generación de autoanticuerpos que son específicos para uno o más tejidos de un animal no humano como se describe en la presente. El potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de BAFF del repertorio de células B puede caracterizarse y/o desarrollarse en un animal no humano como se describe en la presente.

45 Los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse para el reto con uno o más antígenos para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de BAFF de una respuesta inmunitaria, que incluye pero no se limita a, las respuestas específicas dependientes de células T y dependientes de células B a un antígeno determinado.

50 Los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse en experimentos de trasplante o transferencia adoptiva para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de BAFF de linfocitos nuevos y su función inmunológica. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden trasplantarse con células B humanas.

55 Las células de los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse en ensayos de células T para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de BAFF de la respuesta y función dependientes de células T. Los ensayos de células T ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, ELISpot, tinción de citocinas intracelulares, restricción del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), ensayos de supresión viral, ensayos de citotoxicidad, ensayos de proliferación y ensayos de supresión de células T reguladoras.

Las células de los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse en ensayos de crecimiento de células tumorales para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación y/o la estimulación del crecimiento de células tumorales dependiente de BAFF.

5 Una enfermedad o afección autoinmunitaria puede inducirse en uno o más animales no humanos como se describe en la presente para proporcionar un sistema *in vivo* para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de BAFF de una o más funciones de la enfermedad o afección autoinmunitaria. La afección autoinmunitaria puede ser una afección inflamatoria, por ejemplo, artritis (por ejemplo, artritis inducida por colágeno, CIA).

10 Los animales no humanos como se describen en la presente proporcionan un sistema *in vivo* para el análisis y la evaluación de un fármaco o vacuna. Un fármaco o vacuna candidato puede suministrarse a uno o más animales no humanos como se describe en la presente, seguido del control de los animales no humanos para determinar uno o más de la respuesta inmunitaria al fármaco o vacuna, el perfil de seguridad del fármaco o vacuna, o el efecto sobre una enfermedad o afección. Los métodos ilustrativos usados para determinar el perfil de seguridad incluyen mediciones de toxicidad, concentración de dosis óptima, eficacia del fármaco o vacuna, y posibles factores de riesgo.  
15 Tales fármacos o vacunas pueden mejorarse y/o desarrollarse en tales animales no humanos.

Los animales no humanos como se describen en la presente proporcionan un sistema *in vivo* mejorado para el desarrollo y caracterización de productos terapéuticos candidatos para usar en cáncer. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden implantarse con un tumor, seguido de la administración de un producto terapéutico candidato. El tumor puede dejarse durante el tiempo suficiente para su establecimiento en uno o más sitios  
20 dentro del animal no humano. La proliferación, crecimiento, etcétera, de células tumorales puede medirse antes y después de la administración con el producto terapéutico candidato. La citotoxicidad de los productos terapéuticos candidatos puede medirse, además, en el animal no humano según convenga.

Los animales no humanos como se describe en la presente proporcionan un sistema *in vivo* mejorado para dilucidar los mecanismos de interacción célula a célula humana a través de transferencia adoptiva. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden implantarse con un xenoinjerto de tumor, seguido de un segundo implante de linfocitos infiltrantes de tumor en los animales no humanos mediante transferencia adoptiva para determinar la  
25 eficacia en la erradicación de tumores sólidos u otras enfermedades malignas. Tales experimentos pueden realizarse con células humanas (por ejemplo, linfomas de células B) debido a la presencia exclusiva de BAFF humana sin competencia con Baff endógena del animal no humano. Además, las terapias y los agentes farmacéuticos para usar en el xenotrasplante pueden mejorarse y/o desarrollarse en tales animales no humanos.  
30

Los animales no humanos como se describe en la presente proporcionan un sistema *in vivo* mejorado para el mantenimiento y desarrollo de células madre hematopoyéticas humanas a través del injerto. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden proporcionar un mejor desarrollo y mantenimiento de las células madre humanas dentro del animal no humano. Se observa un aumento de las poblaciones de células B y T humanas diferenciadas en la sangre, la médula ósea, el bazo y el timo del animal no humano. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden proporcionar un aumento en el nivel de injerto de células madre hematopoyéticas humanas en comparación con animales no humanos que expresan Baff endógena no humana y BAFF heteróloga (por ejemplo, humana).  
35

Los animales no humanos como se describe en la presente pueden proporcionar un sistema *in vivo* mejorado para el mantenimiento y desarrollo de células B humanas (por ejemplo, de donantes humanos) a través del injerto. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden proporcionar un mejor desarrollo y mantenimiento de las células B humanas dentro del animal no humano. Puede observarse un aumento de las poblaciones de células B humanas diferenciadas posterior a la inmunización en uno o más de la sangre, la médula ósea, el bazo o un ganglio linfático del animal no humano. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden proporcionar un  
40 aumento en el nivel de injerto de células B humanas en comparación con animales no humanos que expresan Baff endógena no humana.  
45

## EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos en la técnica cómo producir y usar los métodos y composiciones de la invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. A menos que se indique de cualquier otra manera, la temperatura se indica en Celsius, y la presión es la atmosférica o cercana a ella.  
50

Ejemplo 1. Humanización de un gen de factor activador de células B (*Baff*) endógeno no humano

Este ejemplo ilustra métodos ilustrativos para humanizar un gen endógeno que codifica el factor activador de células B (*Baff*) en un animal no humano tal como un roedor (por ejemplo, un ratón). Se conoce que el BAFF humano existe en varias formas variantes (o alélicas). Los métodos descritos en este ejemplo pueden emplearse para humanizar un gen *Baff* endógeno de un animal no humano con el uso de cualquier variante (o alelo) humana(o), o combinación de variantes humanas (o alelos o fragmentos de estos) según convenga. En este ejemplo, un gen *BAFF* humano que  
55

aparece en el clon de cromosoma artificial bacteriano (BAC) CTD-2355n18 se emplea para humanizar un gen *Baff* endógeno de un ratón.

Un vector de transformación para la humanización de una región extracelular de un gen *Baff* se construyó con el uso de recombinación homóloga en bacterias y tecnología VELOCIGENE® (ver, por ejemplo, la patente U.S. 6,586,251 y Valenzuela y otros, High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, 2003, Nature Biotech. 21(6):652-659). Un proceso ilustrativo para la humanización de un gen *Baff* endógeno de un ratón se expone en la Figura 2.

Brevemente, un clon de cromosoma artificial bacteriano (BAC) humano CTD-2355n18 (Invitrogen) se modificó para eliminar la región flanqueante 3' del gen *BAFF* humano que comienza a aproximadamente 206 pb 3' del gen *BAFF* humano. La modificación se realizó por recombinación homóloga en células bacterianas con el uso de un vector de transformación que contiene un casete de neomicina autoeliminable flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasa (por ejemplo, *LoxP*; ver las patentes US 8,354,389 y US 8,518,392) y un sitio de restricción *AsiSI* único posicionado en el 3' del casete. El clon de BAC modificado resultante se modificó en una segunda etapa de recombinación homóloga en células bacterianas con el uso de un casete de espectinomicina para eliminar la secuencia 5' del gen *BAFF* humano y los exones 1, 2 y aproximadamente 3 146 pb del intrón 2. El casete de espectinomicina contenía un sitio *I-Ceul* único 3' del casete de espectinomicina. Por lo tanto, el clon de BAC humano con modificación doble contenía, de 5' a 3', un casete de espectinomicina, un sitio *I-Ceul*, aproximadamente 35.303 pb de secuencia genómica humana que contiene la mayor parte del intrón 2 de *BAFF* humano, los exones 3 a 6 de *BAFF* humano y aproximadamente 206 pb de la secuencia humana 3' del exón 6 de *BAFF* humano, y un casete de neomicina autoeliminable flanqueado por sitios *LoxP*, y un sitio *AsiSI* 3'.

Por separado, se modificó un clon de BAC de ratón RP23-351L20 (Invitrogen) para insertar específicamente el clon de BAC humano modificado descrito anteriormente. En una primera etapa, se usó un casete de higromicina flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasa sitio específica (por ejemplo, *Frt*) para eliminar la secuencia que contiene los exones 3-6 y parte del exón 7 de un gen *Baff* de ratón. La 3'UTR y la señal de poliadenilación se mantuvieron. El casete de higromicina incluía sitios de restricción *I-Ceul* y *AsiSI* únicos en los extremos flanqueantes 5' y 3', respectivamente. La recombinación homóloga en células bacterianas con el casete de higromicina dio como resultado una delección de ~25 148 pb en el gen *Baff* de ratón correspondiente a los exones 3-7, dejando intacto ~3 069 pb del intrón 2 de *Baff* de ratón. El extremo 3' del casete de higromicina se dirigió a aproximadamente la mitad de la 3' UTR del gen *Baff* de ratón (del exón 7) en el clon de BAC RP23-351L20. El clon de BAC de ratón modificado que tiene una delección de los exones 3-6 y 7 (en parte) de *Baff* de ratón a partir de la recombinación homóloga con el casete de higromicina se modificó en una segunda etapa con el uso del clon de BAC humano modificado que tiene una delección de los exones 1-2 de *BAFF* humano y ~3 146 pb del intrón 2. Esto se logró a través de los sitios de enzimas de restricción únicos comunes entre los dos clones de BAC modificados. Cada clon de BAC modificado se digirió con *I-Ceul* y *AsiSI* para producir fragmentos cohesivos compatibles (Figura 2). El vector de transformación final, producido por ligación de los fragmentos de restricción compatibles, contenía, de 5' a 3', la secuencia genómica de ratón que contiene los genes *Lig4* y *Abdh13* de ratón, ~14,5 kb de secuencia genómica de ratón, los exones 1 y 2 de un gen *Baff* de ratón, ~3 069 pb del intrón 2 de un gen *Baff* de ratón, un sitio *I-Ceul*, ~35,3 kb de secuencia genómica humana que contiene los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano, un casete de neomicina autoeliminable flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasa, un sitio *AsiSI*, parte de un exón 7 de *Baff* de ratón que incluía una 3'UTR y señal de poliadenilación, y la secuencia genómica de ratón 3' de un gen *Baff* de ratón.

El vector de transformación final se usó para electroporar células madre embrionarias (ES) de ratón *BALB-Rag2<sup>-/-</sup>IL2Rγ<sup>c-/-</sup>* (DKO) para crear células ES modificadas que comprenden un gen *Baff* en un locus *Baff* endógeno que se encuentra humanizado desde aproximadamente la mitad del intrón 2 de un gen *Baff* de ratón (~3 000 pb 3' del sitio donante de corte y empalme) hasta aproximadamente 100 pb 3' del sitio de poliadenilación de un gen *BAFF* humano que se insertó en aproximadamente la mitad de la 3'UTR de un gen *Baff* de ratón (Figura 1). Las células ES transformadas positivamente que contienen un gen *BAFF* humanizado se identificaron mediante un ensayo (Valenzuela y otros, *más arriba*) que detectó la presencia de la secuencia de *BAFF* humano y confirmó la pérdida de las secuencias de *Baff* de ratón. La Tabla 4 expone los cebadores y sondas que se usaron para confirmar la humanización de un gen *Baff* endógeno como se describió anteriormente. *hBAFF*: *BAFF* humano; *mBaff*: *Baff* de ratón.

Los clones positivos de células ES se usaron después para el implante en ratones hembras con el uso del método VELOCIMOUSE® (ver, por ejemplo, la patente U.S. 7,294,754 y Poueymirou y otros, F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses, 2007, Nature Biotech. 25(1):91-99) para generar una camada de crías que contienen una inserción de los exones 3 a 6 de un gen *BAFF* humano en un gen *Baff* endógeno de un ratón. Los ratones que tienen la humanización de los exones 3 a 6 de un gen de *Baff* endógeno se volvieron a confirmar e identificar mediante la genotipificación del ADN aislado a partir de fragmentos de la cola con el uso de una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela y otros, *más arriba*) que detectó la presencia de las secuencias del gen *BAFF* humano. Las crías se genotipifican y las cohortes de animales heterocigotos para la construcción del gen *Baff* humanizado se seleccionan para su caracterización.

TABLA 4

Nombre	Ubicación	Iniciador	Secuencia (5'-3')	
mBaff-1	mBaff intrón 2	Directo	GGACAGCAGATAGGAAAGCTTCTTG	sec. con núm. de ident.: 8
		Inverso	GGGACGGGACACTCATTGAC	sec. con núm. de ident.: 9
		Sonda	TAGGAATCCCAGTCCTTAGAACCGCA	sec. con núm. de ident.: 10
mBaff-2	mBaff exón 7	Directo	CCTCGGGAGAATGCACAGAT	sec. con núm. de ident.: 11
		Inverso	GCACTCCAGCAAGTGAGTTAC	sec. con núm. de ident.: 12
		Sonda	TCACGCAACGGAGACGACACCTT	sec. con núm. de ident.: 13
hBAFF-1	hBAFF intrón 2	Directo	CCGGTTGGCATTCTGGCTTAG	sec. con núm. de ident.: 14
		Inverso	GGCTGGATGGTCAAGTTCTACA	sec. con núm. de ident.: 15
		Sonda	TTCCAGGCTGTAACATGAGTGTTGGA	sec. con núm. de ident.: 16
hBAFF-2	hBAFF intrón 5	Directo	ACACCAGACAGGTGACTTAGGAA	sec. con núm. de ident.: 17
		Inverso	GCTCCTGGGTGCAAAGGTA	sec. con núm. de ident.: 18
		Sonda	TGCGAAAGTGTAGGCGCAAACC	sec. con núm. de ident.: 19

Equivalentes

Habiendo descrito así diversos aspectos de al menos una modalidad de esta invención, los expertos en la técnica apreciarán que pueden idear fácilmente diversas alteraciones, modificaciones, y mejoras. Tales alteraciones, modificaciones, y mejoras están destinados a ser parte de esta descripción, y están destinados a estar dentro del alcance de la invención. En consecuencia, la descripción y figuras anteriores son solo a manera de ejemplo y la invención se describe en detalle en las reivindicaciones que siguen.

El uso de términos ordinales tales como "primero", "segundo", "tercero", etcétera, en las reivindicaciones para modificar un elemento de reivindicación no connota por sí mismo una prioridad, precedencia, u orden de un elemento de reivindicación sobre otro o el orden temporal en el que se realizaron los actos de un método, sino que se usan simplemente como marcadores para distinguir un elemento de reivindicación con un nombre determinado de otro elemento con el mismo nombre (excepto por el uso del término ordinal) para distinguir los elementos de reivindicación.

Debe entenderse que los artículos "un" y "una" como se usan en la presente descripción y en las reivindicaciones incluyen los referentes plurales, a menos que se indique claramente lo contrario. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechos si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean, o son relevantes de cualquier otra manera en un determinado producto o proceso a menos que se indique lo contrario o sea evidente de cualquier otra manera a partir del contexto. La invención incluye modalidades en las que exactamente un miembro del grupo está presente, se emplea, o es relevante de cualquier otra manera en un determinado producto o proceso. La invención incluye, además, modalidades en las que más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean, o son relevantes de cualquier otra manera en un determinado producto o proceso. Además, debe entenderse que la invención abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etcétera, de una o más de las reivindicaciones enumeradas se introducen en otra reivindicación dependiente de la misma reivindicación base (o, según sea relevante, cualquier otra reivindicación) a menos que se indique de cualquier otra manera o a menos que sea evidente para un experto en la técnica que surja una contradicción o inconsistencia. Cuando los elementos se presentan como listas, (por ejemplo, en un grupo Markush o formato similar) debe entenderse que cada subgrupo de los elementos también se describe, y cualquier elemento(s) puede eliminarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando la invención, o aspectos de la invención, se denomina(n) como que comprenden elementos, características particulares, etcétera, determinadas modalidades de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, tales elementos, características, etcétera. Con fines de simplicidad esas modalidades no se han expuesto específicamente de manera detallada en todos los casos en la presente. Debe entenderse, además, que ninguna modalidad o aspecto de la invención puede excluirse explícitamente de las reivindicaciones, independientemente de si la exclusión específica se menciona en la especificación.

Los expertos en la técnica apreciarán estándares de desviación o error típicos atribuibles a valores obtenidos en ensayos u otros procesos descritos en la presente.

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc. McWhirter, John Gurer, Cagan Macdonald, Lynn Murphy, Andrew J.

<120> ANIMALES NO HUMANOS QUE TIENEN UN GEN DE FACTOR ACTIVADOR DE CÉLULAS B HUMANIZADO

<130> 31015 (6800)

<150> 61/905,983

<151> 2013-11-19

<160> 19

<170> PatentIn versión 3,5

<210> 1

<211> 1710

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 1

ES 2 700 972 T3

5 ggcacgagggc agattgagca atccatggaa ggccagagcc agagaaccta cttcagggta 60  
 gcaaaaagatg cagaagaaag tcaggagagc gctcctgggg gaaccagcc ctgccatgct 120  
 ctgagggcag tctcccagga cacagatgac aggaaatgac ccaccctgt ggtcacttac 180  
 tccaaaggcc tagaccttca aagtgtcct cgtggaatgg atgagtctgc aaagacctg 240  
 ccaccaccgt gcctctgttt ttgctccgag aaaggagaag atatgaaagt gggatatgat 300  
 cccatcactc cgcagaagga ggagggtgcc tggtttggga tctgcagga tggaaggctg 360  
 ctggctgcta ccctcctgct ggccctgttg tccagcagtt tcacagcgat gtcctgttac 420  
 cagttggctg ccttgcaagc agacctgatg aacctgcgca tggagctgca gagctaccga 480  
 ggttcagcaa caccagccgc cgggggtgct ccagagtga ccgctggagt caaactcctg 540  
 10 acaccggcag ctctcgacc ccacaactcc agcccgggc acaggaacag acgcgctttc 600  
 cagggaccag aggaaacaga acaagatgta gacctctcag ctctcctgc accatgctg 660  
 cctggatgcc gccatttctca acatgatgat aatggaatga acctcagaaa catcattcaa 720  
 gactgtctgc agctgattgc agacagcgac acgccgacta tacgaaaagg aacttacaca 780  
 tttgttccat ggcttctcag ctttaaaaga ggaaatgcct tggaggagaa agagaacaaa 840  
 atagtgtgta ggcaaacagg ctatttcttc atctacagcc aggttctata cacggacccc 900  
 15 atctttgcta tgggtcatgt catccagagg aagaaagtac acgtctttgg ggacgagctg 960  
 agcctggtga ccctgttccg atgtattcag aatatgccca aaactgccc caacaattcc 1020  
 tgctactcgg ctggcatcgc gaggctggaa gaaggagatg agattcagct tgcaattcct 1080  
 cgggagaatg cacagatttc acgcaacgga gacgacacct tctttggtgc ctaaaaactg 1140  
 ctgtaactca cttgctggag tgcgtgatcc ccttccctcg tcttctctgt acctccgagg 1200  
 20 gagaacaga cgactggaaa aactaaaaga tggggaaagc cgtcagcgaa agttttctcg 1260  
 tgacccttg aatctgatcc aaaccaggaa atataacaga cagccacaac cgaagtgtgc 1320  
 catgtgagtt atgagaaacg gagcccgcgc tcagaaagac cggatgagga agaccgtttt 1380  
 ctccagtcct ttgccaacac gcaccgcaac cttgcttttt gccttgggtg acacatgttc 1440  
 agaatgcagg gagatttcct tgttttgca tttgccatga gaagagggcc cacaactgca 1500  
 25 ggtcactgaa gcattcacgc taagtctcag gatttactct cccttctcat gctaagtaca 1560  
 cacacgctct tttccaggta atactatggg atactatgga aaggttgttt gtttttaaat 1620  
 ctagaagtct tgaactggca atagacaaaa atccttataa attcaagtgt aaaataaact 1680  
 taattaataa ggtttaagtg tgaaaaaaaa 1710

30 <210> 2  
 <211> 309  
 <212> PRT

<213> Mus musculus

35 <400>2

ES 2 700 972 T3

Met Asp Glu Ser Ala Lys Thr Leu Pro Pro Pro Cys Leu Cys Phe Cys  
 1 5 10 15

Ser Glu Lys Gly Glu Asp Met Lys Val Gly Tyr Asp Pro Ile Thr Pro  
 20 25 30

Gln Lys Glu Glu Gly Ala Trp Phe Gly Ile Cys Arg Asp Gly Arg Leu  
 35 40 45

Leu Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Ser Ser Phe Thr Ala  
 50 55 60

Met Ser Leu Tyr Gln Leu Ala Ala Leu Gln Ala Asp Leu Met Asn Leu  
 65 70 75 80

Arg Met Glu Leu Gln Ser Tyr Arg Gly Ser Ala Thr Pro Ala Ala Ala  
 85 90 95

Gly Ala Pro Glu Leu Thr Ala Gly Val Lys Leu Leu Thr Pro Ala Ala  
 100 105 110

Pro Arg Pro His Asn Ser Ser Arg Gly His Arg Asn Arg Arg Ala Phe  
 115 120 125

Gln Gly Pro Glu Glu Thr Glu Gln Asp Val Asp Leu Ser Ala Pro Pro  
 130 135 140

5

10

15

20

25

30

35

ES 2 700 972 T3

Ala Pro Cys Leu Pro Gly Cys Arg His Ser Gln His Asp Asp Asn Gly  
 145 150 155 160

Met Asn Leu Arg Asn Ile Ile Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp  
 165 170 175

5 Ser Asp Thr Pro Thr Ile Arg Lys Gly Thr Tyr Thr Phe Val Pro Trp  
 180 185 190

Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Asn Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys  
 195 200 205

10 Ile Val Val Arg Gln Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Ser Gln Val Leu  
 210 215 220

Tyr Thr Asp Pro Ile Phe Ala Met Gly His Val Ile Gln Arg Lys Lys  
 225 230 235 240

Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys  
 245 250 255

15 Ile Gln Asn Met Pro Lys Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala  
 260 265 270

Gly Ile Ala Arg Leu Glu Glu Gly Asp Glu Ile Gln Leu Ala Ile Pro  
 275 280 285

20 Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Arg Asn Gly Asp Asp Thr Phe Phe Gly  
 290 295 300

Ala Leu Lys Leu Leu  
 305

<210>3  
 <211>290  
 <212>PRT  
 <213> Mus musculus

<400>3

30 Met Asp Glu Ser Ala Lys Thr Leu Pro Pro Pro Cys Leu Cys Phe Cys  
 1 5 10 15

Ser Glu Lys Gly Glu Asp Met Lys Val Gly Tyr Asp Pro Ile Thr Pro  
 20 25 30

35 Gln Lys Glu Glu Gly Ala Trp Phe Gly Ile Cys Arg Asp Gly Arg Leu  
 35 40 45

ES 2 700 972 T3

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

40 <210>4  
 <211>2675  
 <212>ADN  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400>4

ES 2 700 972 T3

5 gaaattctta caaaaactga aagtgaaatg aggaagacag attgagcaat ccaatcggag 60  
 ggtaaatgcc agcaaaccta ctgtacagta ggggtagaga tgcagaaagg cagaaaggag 120  
 aaaattcagg ataactctcc tgaggggtga gccaagccct gccatgtagt gcacgcagga 180  
 10 catcaacaaa cacagataac aggaaatgat ccattccctg tggtcactta ttctaaaggc 240  
 cccaaccttc aaagttcaag tagtgatatg gatgactcca cagaaaggga gcagtcacgc 300  
 cttacttctt gccttaagaa aagagaagaa atgaaactga aggagtgtgt ttccatcctc 360  
 15 ccacggaagg aaagcccctc tgtccgatcc tccaaagacg gaaagctgct ggctgcaacc 420  
 ttgctgctgg cactgctgtc ttgctgcctc acggtggtgt ctttctacca ggtggccgcc 480  
 ctgcaagggg acctggccag cctccgggca gagctgcagg gccaccacgc ggagaagctg 540  
 20 ccagcaggag caggagcccc caaggccggc ctggaggaag ctccagctgt caccgcggga 600  
 ctgaaaatct ttgaaccacc agctccagga gaaggcaact ccagtcagaa cagcagaaat 660  
 aagcgtgccg ttcaggggtcc agaagaaaca gtcactcaag actgcttgca actgattgca 720  
 25 gacagtgaaa caccaactat acaaaaagga tcttacacat ttgttccatg gcttctcagc 780  
 tttaaaaggg gaagtgccct agaagaaaaa gagaataaaa tattggtcaa agaaactggt 840  
 tactttttta tatatggtca ggttttatat actgataaga cctacgccat gggacatcta 900  
 30 attcagagga agaaggtcca tgtctttggg gatgaattga gtctggtgac tttgtttoga 960  
 tgtattcaaa atatgcctga aacactacc c aataattcct gctattcagc tggcattgca 1020  
 35 aaactggaag aaggagatga actccaactt gcaataccaa gagaaaatgc acaaatatca 1080  
 ctggatggag atgtcacatt ttttgggtgca ttgaaactgc tgtgacctac ttacaccatg 1140  
 tctgtagcta ttttctccc tttctctgta cctctaagaa gaaagaatct aactgaaaat 1200  
 40 accaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaagtagtt accattgcct tttctgtgag 1260  
 ctatttgttt tggtttgctg aaactagtcc aaaacaggaa atttaacaga cagccacagc 1320  
 caaagagtgt catgtgaatt acaagaaata gagcccattt agggaaagat agaactagaa 1380  
 45 aggcttttca ttataattcc atggtgaaca attgagtcac agcttcttat cttggaggaa 1440  
 ggacacaatt caaaggggca gtaaggattt tgtaaacgt ggcacccata atttactatg 1500  
 50 gagcaagtgc ccacatctct aggacattaa gacatttatg agaaatctca ggattcatct 1560  
 tctgttttta tgttaaatgc actccctcct tttcagttaa cattataaaa agtaaaaaat 1620

55

60

65

ES 2 700 972 T3

5 gaaaatttta gaaatcttgc attagacaca tgaaaaaata actaaaagtt taaatttaaa 1680  
 tatgaaacaa ttttgctgaa aatagtatcc atatactatt taagtctttt atggttattt 1740  
 caagtataca atttctatct gtaatgtaat atattaccca cacatTTTTT tcacaggaga 1800  
 gagagaatat cctcatttgt ttatgctcat gtgtattttc tatagtgaat ttcagaaaact 1860  
 10 ttaaatatca ggtaatttca atttatgcct ataaagcatt gattgaaaaa taactagaat 1920  
 tgtgcatata taacacataa tctccaacag aagttactga atacattcat actaatgtaa 1980  
 15 tghtaatttcc ctttatttct tgctcttctg tttcaaaactg ctgctattgt agtttacata 2040  
 toccaacctt taaaaatatt cctcttatta gctttatatt cactttatag aagttgagtt 2100  
 ttaattaaaa ttcttggcat cctgaagtat gtcacatagc atgtgctcct tataaatatg 2160  
 20 ttgatatctc agaagacagc atcccggttt tcattttata aagtaccata cttagaatg 2220  
 ctgtaatact tatcttttat aacatgtttc cttcgctttg cttgtctttt atgtcatcag 2280  
 ttttaactgt ttacttcatt taacagttta catcattcaa cagtttactt cattaacag 2340  
 25 taggtggaaa aatagatgcc agtctatgaa aatcttccca tctatatcaa aatacttttc 2400  
 aaggatatac ttttcaaac aaacgattta aattttatgt ttaaaatata aactttagat 2460  
 ttaaacttta ttaaatatc tggttcctat gattttgact tcagtaagtt caaataaaat 2520  
 30 atattttgca attcattttt acattataat ttaaaaagaa gaagcgataa gtggagtcag 2580  
 tttcaatgct aggtggggtg gttaatgatt tttctggtgt tgctgctaata gtggattaac 2640  
 35 aaataaaaaac attcattgcc ttttgcctca taaaa 2675

<210>5

<211>285

<212>PRT

40 <213> Homo sapiens

<400>5

45 Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu  
 1 5 10 15  
 Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro  
 20 25 30  
 Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu  
 35 40 45  
 55 Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val  
 50 55 60  
 Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg  
 65 70 75 80

65

ES 2 700 972 T3

Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly  
85 90 95

5 Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu  
100 105 110

Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn  
115 120 125

10 Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln  
130 135 140

Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys  
145 150 155 160

Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser  
165 170 175

15 Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr  
180 185 190

Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met  
195 200 205

Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu  
210 215 220

20 Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu  
225 230 235 240

Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly  
245 250 255

25 Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu  
260 265 270

Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu  
275 280 285

30 <210>6  
<211>266  
<212>PRT  
<213> Homo sapiens

35 <400>6  
Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu  
1 5 10 15

40

ES 2 700 972 T3

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

<210>7

<211>278

<212>PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína Baff humanizada

ES 2 700 972 T3

<400>7

Met Asp Glu Ser Ala Lys Thr Leu Pro Pro Pro Cys Leu Cys Phe Cys  
 1 5 10 15

Ser Glu Lys Gly Glu Asp Met Lys Val Gly Tyr Asp Pro Ile Thr Pro  
 20 25 30

Gln Lys Glu Glu Gly Ala Trp Phe Gly Ile Cys Arg Asp Gly Arg Leu  
 35 40 45

Leu Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Ser Ser Phe Thr Ala  
 50 55 60

Met Ser Leu Tyr Gln Leu Ala Ala Leu Gln Ala Asp Leu Met Asn Leu  
 65 70 75 80

Arg Met Glu Leu Gln Ser Tyr Arg Gly Ser Ala Thr Pro Ala Ala Ala  
 85 90 95

Gly Ala Pro Glu Leu Thr Ala Gly Val Lys Leu Leu Thr Pro Ala Ala  
 100 105 110

Pro Arg Pro His Asn Ser Ser Arg Gly His Arg Asn Arg Arg Ala Phe  
 115 120 125

Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala  
 130 135 140

Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro  
 145 150 155 160

Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn  
 165 170 175

Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val  
 180 185 190

Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His Leu Ile Gln Arg Lys  
 195 200 205

Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg  
 210 215 220

Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser  
 225 230 235 240

Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile  
 245 250 255

Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe  
 260 265 270

Gly Ala Leu Lys Leu Leu  
 275

<210>8  
 <211>25  
 <212>ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético: mBaff-1, intrón 2 de mBaff, Directo  
  
 10 <400>8  
 ggacagcaga taggaaagct tcttg 25  
  
 <210>9  
 <211>20  
 15 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético: mBaff-1, intrón 2 de mBaff, Inverso  
 20  
 <400>9  
 gggacggaca ctcatcttgac 20  
  
 <210>10  
 <211>26  
 25 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 30 <223> Oligonucleótido sintético: mBaff-1, intrón 2 de mBaff, Sonda  
  
 <400>10  
 taggaatccc agtccttaga accgca 26  
  
 35 <210>11  
 <211>20  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético: mBaff-2, exón 7 de mBaff, Directo  
 <400>11  
 cctcgggaga atgcacagat 20  
  
 45 <210>12  
 <211>21  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético: mBaff-2, exón 7 de mBaff, Inverso  
  
 <400>1  
 55 gcaactccagc aagtgagta c 21  
  
 <210>13  
 <211>23  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético: mBaff-2, exón 7 de mBaff, Sonda  
  
 <400>13  
 65 tcacgcaacg gagacgacac ctt 23

<210>14  
 <211>22  
 <212>ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético: hBaff-1, intrón 2 de hBAFF, Directo  
  
 10 <400>14  
 ccggttgca ttctggctt ag 22  
  
 <210>15  
 <211>22  
 15 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético: hBaff-1, intrón 2 de hBAFF, Inverso  
 20  
 <400>15  
 ggctgatgg tcaagttca ca 22  
  
 <210>16  
 <211>26  
 25 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 30 <223> Oligonucleótido sintético: hBaff-1, intrón 2 de hBAFF, Sonda  
  
 <400>16  
 ttccaggctg taacatgagt gttgga 26  
  
 35 <210>17  
 <211>23  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético: hBaff-2, intrón 5 de hBAFF, Directo  
  
 <400>17  
 45 acaccagaca ggtgacttag gaa 23  
  
 <210>18  
 <211>19  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético: hBaff-2, intrón 5 de hBAFF, Inverso  
  
 <400>18  
 55 gtcctgggt gcaaagta 19  
  
 <210>19  
 <211>22  
 <212>ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético: hBaff-2, intrón 5 de hBAFF, Sonda  
  
 <400>19  
 65 tgcgaaagt taggcgcaaa cc 22

## REIVINDICACIONES

1. Un roedor modificado genéticamente cuyo genoma comprende un reemplazo de un fragmento genómico de un gen *Baff* endógeno de roedor con un fragmento genómico humano que comprende los exones 3-6 de un gen *Baff* humano para formar un gen *Baff* humanizado, en donde el reemplazo es en un locus *Baff* endógeno de roedor, en donde el gen *Baff* humanizado se encuentra bajo el control del promotor de *Baff* de roedor en dicho locus *Baff* endógeno de roedor y codifica una proteína Baff humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína BAFF humana codificada por dicho gen *BAFF* humano unida a una porción intracelular de la proteína Baff de roedor codificada por dicho gen *Baff* de roedor, y en donde dicho roedor modificado genéticamente expresa dicha proteína Baff humanizada.
2. El roedor modificado genéticamente de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho roedor no expresa de manera detectable una proteína Baff endógena de roedor de longitud completa.
3. El roedor modificado genéticamente de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho roedor es un ratón o una rata.
4. El animal roedor modificado genéticamente de conformidad con la reivindicación 3, en donde dicho roedor es un ratón.
5. El roedor modificado genéticamente de conformidad con la reivindicación 4, en donde el fragmento genómico de un gen *Baff* endógeno de ratón que se reemplaza comprende los exones 3, 4, 5, 6 y una porción del exón 7 de dicho gen *Baff* endógeno de ratón.
6. El roedor modificado genéticamente de conformidad con la reivindicación 5, en donde la proteína Baff humanizada comprende los aminoácidos 142 a 285 de la sec. con núm. de ident.: 5.
7. El roedor modificado genéticamente de conformidad con la reivindicación 1 o 6, en donde el gen *Baff* humanizado comprende el exón 1 y el exón 2 de dicho gen *Baff* endógeno.
8. El roedor modificado genéticamente de conformidad con la reivindicación 7, en donde dicha proteína Baff humanizada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la sec. con núm. de ident.: 7.
9. El roedor modificado genéticamente de conformidad con la reivindicación 1 o 5 en donde los exones codificantes del gen *Baff* humanizado consisten en los exones 1 y 2 de dicho gen *Baff* endógeno y los exones 3-6 de dicho gen *Baff* humano.
10. Una célula o tejido aislado de un roedor modificado genéticamente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
11. Una célula madre embrionaria (ES) de ratón, cuyo genoma comprende un reemplazo de los exones 3-6 y una porción del exón 7 de un gen *Baff* endógeno de ratón con un fragmento genómico humano que comprende los exones 3-6 de un gen *BAFF* humano para formar un gen *Baff* humanizado, en donde el reemplazo es en un locus *Baff* endógeno de ratón, en donde el gen *Baff* humanizado se encuentra bajo el control del promotor de *Baff* de ratón en dicho locus *Baff* endógeno de ratón, y codifica una proteína Baff humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína BAFF humana codificada por dicho gen *BAFF* humano unida a una porción intracelular de la proteína Baff de ratón codificada por dicho gen *Baff* de ratón.
12. Un embrión de ratón generado a partir de la célula ES de conformidad con la reivindicación 11.
13. Un método para producir un roedor que expresa una proteína Baff humanizada a partir de un locus *Baff* endógeno, el método comprende las etapas de:
  - (a) reemplazar un fragmento genómico de un gen *Baff* endógeno de roedor en un locus *Baff* endógeno en una célula madre embrionaria (ES) de roedor con un fragmento genómico que comprende los exones 3-6 de un gen *BAFF* humano para formar un gen *Baff* humanizado en el locus *Baff* endógeno de roedor, en donde el gen *Baff* humanizado se encuentra bajo el control del promotor de *Baff* de roedor en dicho locus *Baff* endógeno de roedor y codifica una proteína Baff humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína BAFF humana codificada por dicho gen *BAFF* humano unida a una porción intracelular de la proteína Baff de roedor codificada por dicho gen *Baff* de roedor;
  - (b) obtener una célula ES de roedor modificada que comprende dicho gen *Baff* humanizado en el locus *Baff* endógeno de roedor; y,
  - (c) crear un roedor con el uso de la célula ES modificada de (b).
14. El método de conformidad con la reivindicación 13, en donde el roedor es un ratón o una rata.

15. El método de conformidad con la reivindicación 13 o 14, en donde dicho roedor no expresa de manera detectable una proteína Baff endógena de roedor de longitud completa.
16. Un método para injertar células humanas en un ratón, en donde dicho ratón es capaz de recibir células humanas trasplantadas, el método comprende las etapas de:
- 5
- (a) proporcionar un ratón cuyo genoma comprende un reemplazo de los exones 3-6 y una porción del exón 7 de un gen *Baff* endógeno de ratón con un fragmento genómico humano que comprende los exones 3-6 de un gen *BAFF* humano para formar un gen *Baff* humanizado, en donde el reemplazo es en un locus *Baff* endógeno de ratón, en donde el gen *Baff* humanizado se encuentra bajo el control del promotor de *Baff* de ratón en dicho locus *Baff* endógeno de ratón y codifica una proteína Baff humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína BAFF humana codificada por dicho gen *BAFF* humano unida a una porción intracelular de la proteína Baff de ratón codificada por dicho gen *Baff* de ratón; y
- 10
- (b) trasplantar una o más células humanas en el ratón.
- 15 17. El método de conformidad con la reivindicación 16, en donde las células humanas son células madre hematopoyéticas humanas.



