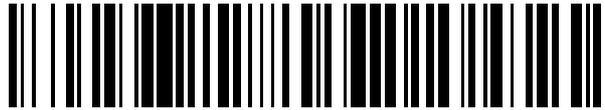


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 549**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2014 PCT/US2014/064810**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15077072**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2014 E 14835599 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 3071025**

54 Título: **Animales no humanos que tienen un gen de un ligando inductor de la proliferación humanizado**

30 Prioridad:

19.11.2013 US 201361905986 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2019

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 2 703 549 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 un ligando inductor de la proliferación humanizado

5 Referencia cruzada con la solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 61/905,986, presentada el 19 de noviembre de 2013.

10 Listado de secuencias

Un listado de secuencias en el archivo de texto ASCII, denominado 31016_6825_SEQ.txt de 32 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.

15 Antecedentes de la invención

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 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 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.

Stein y otros (J Clin Invest. 2002 Jun; 109(12):1587-98) se refiere a la modulación de la inmunidad de células B y T por APRIL. Kostenuik y otros (J Bone Miner Res. 2009 Feb; 24(2):182-95) se refiere a denosumab, un anticuerpo monoclonal completamente humano para RANKL, que inhibe la resorción ósea y aumenta BMD en ratones con activación génica que expresan RANKL quimérica (murina/humana).

35 Resumen de la invención

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 invención se basa además en el reconocimiento de que los animales no humanos que tienen un gen *April* humanizado y/o que expresan, contienen, o producen de cualquier otra manera una proteína April humana o humanizada son convenientes, por ejemplo para usar en el injerto de células madre hematopoyéticas o células B humanas de donantes humanos.

La invención proporciona un roedor modificado genéticamente cuyo genoma comprende un reemplazo de un fragmento genómico que comprende los exones 2-5 y la porción codificante del exón 6 de un gen de ligando inductor de la proliferación (*A Proliferation-Inducing Ligand, April*) endógeno de roedor con un fragmento genómico humano que comprende los exones 2-6 de un gen *APRIL* humano para formar un gen *April* humanizado, en donde el reemplazo es en un locus *April* endógeno de roedor, en donde el gen *April* humanizado se encuentra bajo el control de un promotor de *April* de roedor en dicho locus *April* endógeno de roedor, y codifica una proteína April humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína *APRIL* humana codificada por dicho gen *APRIL* humano unida a una porción intracelular de la proteína April de roedor codificada por dicho gen *April* de roedor, y en donde dicho roedor modificado genéticamente expresa dicha proteína April humanizada.

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

La invención proporciona además una célula madre embrionaria (ES) de roedor, cuyo genoma comprende un reemplazo de un fragmento genómico que comprende los exones 2-5 y la porción codificante del exón 6 de un gen *April* endógeno de roedor con un fragmento genómico humano que comprende los exones 2-6 de un gen *APRIL* humano para formar un gen *April* humanizado, en donde el reemplazo es en un locus *April* endógeno de roedor, en donde el gen *April* humanizado se encuentra bajo el control de un promotor de *April* de roedor en dicho locus *April* endógeno de roedor, y codifica una proteína April humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína

APRIL humana codificada por dicho gen *APRIL* humano unida a una porción intracelular de la proteína April de roedor codificada por dicho gen *April* de roedor.

La invención proporciona adicionalmente un embrión de roedor generado a partir de la célula ES de la invención.

La invención proporciona además un método para producir un roedor que expresa una proteína April humanizada a partir de un locus *April* endógeno, el método comprende las etapas de: (a) reemplazar un fragmento genómico que comprende los exones 2-5 y la porción codificante del exón 6 de un gen *April* endógeno de roedor en un locus *April* endógeno en una célula madre embrionaria (ES) de roedor con un fragmento genómico que comprende los exones 2-6 de un gen *APRIL* humano para formar un gen *April* humanizado en el locus *April* endógeno de roedor, en donde el gen *April* humanizado se encuentra bajo el control del promotor de *April* de roedor en dicho locus *April* endógeno de roedor y codifica una proteína April humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína *APRIL* humana codificada por dicho gen *APRIL* humano unida a una porción intracelular de la proteína April de roedor codificada por dicho gen *April* de roedor; (b) obtener una célula ES de roedor modificada que comprende dicho gen *April* humanizado en el locus *April* endógeno de roedor; y, (c) crear un roedor con el uso de la célula ES modificada de (b).

La invención proporciona además un método para injertar células humanas en un ratón, el método comprende las etapas de: (a) proporcionar un ratón cuyo genoma comprende un reemplazo de un fragmento de roedor que comprende los exones 2-5 y la porción codificante del exón 6 de un gen *April* endógeno de ratón con un fragmento genómico humano que comprende los exones 2-6 de un gen *APRIL* humano para formar un gen *April* humanizado, en donde el reemplazo es en un locus *April* endógeno de ratón, en donde el gen *April* humanizado se encuentra bajo el control del promotor de *April* de ratón en dicho locus *April* endógeno de ratón y codifica una proteína April humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína *APRIL* humana codificada por dicho gen *APRIL* humano unida a una porción intracelular de la proteína April de ratón codificada por dicho gen *April* de ratón; y (b) trasplantar una o más células humanas en el ratón, opcionalmente; en donde las células humanas son células madre hematopoyéticas humanas.

En la presente descripción se describe un animal no humano que expresa un polipéptido April que comprende la porción extracelular de una proteína *APRIL* humana unida a la porción intracelular de una proteína April no humana.

Una porción extracelular de una proteína *APRIL* humana puede estar codificada por los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano.

Los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* 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 2 a 6 de un gen *APRIL* humano que aparece en la Tabla 3. Los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano pueden ser 100 % idénticos a los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano que aparece en la Tabla 3.

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

Un polipéptido April puede expresarse a partir de un gen *April* modificado genéticamente en un locus *April* endógeno no humano. Un gen *April* modificado genéticamente puede comprender un exón 1 de *April* no humano. Un gen *April* modificado genéticamente puede comprender un exón 6 de *April* no humano en su totalidad o en parte. Un gen *April* modificado genéticamente puede comprender un exón 1 de *April* no humano, un exón 6 de *April* no humano en su totalidad o en parte, o una combinación de estos. Un exón 6 de *April* no humano puede comprender en parte una región no traducida (UTR) en 3' de *April* no humano y una señal de poliadenilación de *April* no humano.

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

Un gen *April* humanizado como se describe en la presente descripción puede comprender los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano. Un gen *April* humanizado puede comprender además un exón 1 de *April* no humano. Un gen *April* humanizado puede comprender además un exón 6 de *April* no humano en su totalidad o en parte. Un gen *April* humanizado puede comprender un exón 1 no humano y un exón 6 no humano en su totalidad o en parte. Un exón 6 de *April* no humano puede comprender en parte una región no traducida (UTR) en 3' de *April* no humano y una señal de poliadenilación de *April* no humano.

Los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* 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 2 a 6 de un gen *APRIL* humano que aparece en la Tabla 3. Los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano pueden ser 100 % idénticos a los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano que aparece en la Tabla 3.

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

En la presente descripción se describe además un locus (o gen) *April* humanizado que comprende uno o más exones de un gen *April* no humano unidos operativamente a uno o más exones de un gen *APRIL* humano.

10 Un locus (o gen) *April* humanizado como se describe en la presente descripción puede comprender un exón 1 de *April* no humano unido operativamente a los exones 2 a 6 de *APRIL* humano. Un locus (o gen) *April* humanizado puede comprender además regiones no traducidas (UTR) en 5' y 3' no humanas que flanquean el exón 1 de *April* no humano y el exón 6 de *APRIL* humano.

15 En la presente descripción se describe además un polipéptido April codificado por el locus (o gen) *April* humanizado como se describe en la presente descripción.

20 En la presente descripción se describe además una célula o tejido aislado a partir de un animal no humano como se describe en la presente descripción. Una célula se selecciona de una célula dendrítica, un linfocito (por ejemplo, una célula B o T), un macrófago y un monocito. 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, ovario, y/o una combinación de estos.

25 En la presente descripción se describe además una célula o tejido no humano (por ejemplo, de roedor) aislado cuyo genoma incluye un gen (o locus) *April* que comprende uno o más exones de un gen *April* no humano unidos operativamente a uno o más exones de un gen *APRIL* humano. En la presente descripción se describe además una célula o tejido no humano (por ejemplo, de roedor) aislado cuyo genoma incluye un gen (o locus) *April* que comprende los exones 1 y 6, en su totalidad o en parte, de *April* no humano unidos operativamente a los exones 2 a 6 de *APRIL* humano, en donde el gen (o locus) *April* comprende además las regiones no traducidas (UTR) en 5' y 3' no humanas que flanquean el exón 1 de *April* no humano y el exón 6 de *APRIL* humano. Un gen (o locus) *April* puede comprender una secuencia que codifica un polipéptido April que comprende los residuos 87 a 250 de una proteína APRIL humana.

35 En la presente descripción se describe además una célula madre embrionaria (ES) no humana cuyo genoma comprende un gen (o locus) *April* como se describe en la presente descripción. La célula ES puede comprender un gen *April* que codifica la porción extracelular de una proteína APRIL humana unida a la porción intracelular de una proteína April de ratón. La célula ES puede comprender un gen *April* que comprende los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano. La célula ES puede ser una célula ES de roedor. Una célula ES no humana como se describe en la presente descripción puede ser una célula ES de ratón o rata.

40 En la presente descripción se describe además el uso de una célula madre embrionaria no humana como se describe en la presente descripción 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 *April* como se describe en la presente descripción.

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

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

60 Dicha secuencia de nucleótidos humana puede comprender los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano. Dicha secuencia de nucleótidos humana puede comprender los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* 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 2 a 6 de un gen *APRIL* humano que aparece en la Tabla 3. Dicha secuencia de nucleótidos humana puede comprender los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano que son 100 % idénticos a los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano que aparece en la Tabla 3.

65 Dicha secuencia de nucleótidos humana puede codificar los residuos de aminoácidos 87 a 250 de una proteína APRIL humana. Dicha secuencia de nucleótidos humana puede codificar los residuos de aminoácidos 87 a 250 de una

proteína APRIL 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 87 a 250 de una proteína APRIL humana que aparece en la Tabla 3. Dicha secuencia de nucleótidos humana puede codificar los residuos de aminoácidos 87 a 250 de una proteína APRIL humana que son 100 % idénticos a los residuos de aminoácidos 87 a 250 de una proteína APRIL humana que aparece en la Tabla 3.

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

En la presente descripción se describe además un método para proporcionar un ratón cuyo genoma incluye un gen *April* que codifica la porción extracelular de una proteína APRIL humana unida a la porción intracelular de una proteína April de ratón, el método comprende modificar el genoma de un ratón de manera que comprenda un gen *April* que codifica la porción extracelular de una proteína APRIL humana unida a la porción intracelular de una proteína April de ratón para proporcionar de este modo dicho ratón. Un gen *April* puede ser un gen *April* como se describe en la presente descripción. Un gen *April* puede ser uno que codifica una proteína cuya secuencia refleja una proteína April humanizada que aparece en la Tabla 3. Un gen *April* puede comprender los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano.

Un gen *April* humanizado como se describe en la presente descripción puede comprender los exones 2, 3, 4, 5 y 6 de un gen *APRIL* humano. Una porción extracelular de una proteína April humanizada como se describe en la presente descripción puede comprender los aminoácidos correspondientes a los residuos 87 a 250 de una proteína APRIL humana que aparece en la Tabla 3. Una proteína April humanizada como se describe en la presente descripción puede comprender una secuencia de una proteína April humanizada que aparece en la Tabla 3. Un gen *April* humanizado como se describe en la presente descripción puede unirse operativamente a un promotor de *April* de ratón.

En la presente descripción 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 *April* que codifica la porción extracelular de una proteína APRIL humana unida a la porción intracelular de una proteína April de ratón (como se describe en la presente descripción descripción), 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 no comprende un gen *April* que codifica la porción extracelular de una proteína APRIL humana unida a la porción intracelular de una proteína April de ratón.

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

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

En la presente descripción se 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 descripción, 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.

En la presente descripción se describe además el uso de un animal no humano como se describe en la presente descripción 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 descripción pueden ser roedores, preferentemente un ratón o una rata.

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.

Otras características, objetivos, y ventajas como se describe en la presente descripción pueden ser evidentes en la descripción detallada a continuación. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada, si bien indica modalidades como se describe en la presente descripción, 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

Los dibujos incluidos en la presente descripción, que se componen de las siguientes Figuras, solo tienen propósitos de ilustración y no de limitación.

La Figura 1 muestra un diagrama, no a escala, de la organización genómica de los genes de ligando inductor de la proliferación (A Proliferation-Inducing Ligand, *APRIL*) no humano (por ejemplo, de ratón) y humano ilustrativos. Los exones se enumeran debajo de cada exón.

La Figura 2A y la 2B muestran diagramas, no a escala, de un método ilustrativo para producir un vector de transformación para la humanización de un gen de ligando inductor de la proliferación (A Proliferation-Inducing Ligand, *April*) no humano. Las secuencias no humanas se muestran como símbolos negros, cerrados. Las secuencias humanas se muestran en símbolos abiertos, de relleno diagonal. SDC Neo: casete de selección por neomicina autoeliminable. *LoxP*: Secuencia del sitio de reconocimiento diana de Cre. CM: casete de selección por cloranfenicol. Se indican los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción (por ejemplo, *AsiSI*, *MluI*, *HindIII*, etcétera).

La Figura 3A y la 3B muestran diagramas, no a escala, de un método ilustrativo alternativo para producir un vector de transformación para la humanización de un gen de ligando inductor de la proliferación (A Proliferation-Inducing Ligand, *April*) no humano. Las secuencias no humanas se muestran como símbolos negros, cerrados. Las secuencias humanas se muestran en símbolos abiertos, de relleno diagonal. SDC Neo: casete de selección por neomicina autoeliminable. *LoxP*: Secuencia del sitio de reconocimiento diana de la recombinasa Cre. CM: casete de selección por cloranfenicol. Spec: casete de selección por espectinomicina. Hyg: casete de selección por higromicina. Frt: Secuencia del sitio de reconocimiento diana de la recombinasa Flp. Se indican los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción (por ejemplo, *AsiSI*, *MluI*, *HindIII*, *I-CeuI*, etcétera).

La Figura 4 muestra (A) una ilustración esquemática, no a escala, de un transcrito de ARNm de un gen *April* humanizado que indica los exones humanos y de ratón (por ejemplo, Ex 1, Ex 2, etcétera) y las ubicaciones de cebadores ilustrativos usados para detectar los transcritos expresados a partir de un gen *April* humanizado, y (B) un gel de electroforesis ilustrativo que muestra los productos de PCR amplificados a partir de ARNm aislado de médula ósea y esplenocitos de ratones de tipo silvestre (n=2) y ratones heterocigotos para un gen *April* humanizado (n=4). De izquierda a derecha: Carril 1: vacío; Carril 2: Escalera de ADN de 100 pb (New England Biolabs); Carril 3: vacío; Carril 4: médula ósea de tipo silvestre; Carril 5: médula ósea de tipo silvestre; Carril 6: médula ósea con *April* humanizado; Carril 7: médula ósea con *April* humanizado; Carril 8: médula ósea con *April* humanizado; Carril 9: médula ósea con *April* humanizado; Carril 10: esplenocito de tipo silvestre; Carril 11: esplenocito de tipo silvestre; Carril 12: esplenocito con *April* humanizado; Carril 13: esplenocito con *April* humanizado; Carril 14: esplenocito con *April* humanizado; Carril 15: esplenocito con *April* humanizado; Carril 16: vacío. 500 pb: indica el tamaño de la banda más intensa para el marcador de peso molecular en el Carril 2.

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.

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.

El término "*aproximadamente*" como se aplica en la presente descripción a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia indicado. 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).

El término "*biológicamente activo*" como se usa en la presente descripción 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*".

El término "*comparable*", como se usa en la presente descripción, se refiere a dos o más agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etcétera, que pueden no ser idénticos entre sí pero que son suficientemente similares para permitir la comparación entre ellos de manera que puedan obtenerse conclusiones de manera razonable en base a las diferencias o las similitudes observadas. Los expertos en la materia 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.

El término "*conservadora*" como se usa en la presente descripción 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 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.

El término "*interrupción*" como se usa en la presente descripción se refiere al resultado de un evento que interrumpe (por ejemplo, por medio de recombinación homóloga) una molécula de 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 presentar 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; en algunos de estos casos, una interrupción 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 la actividad 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 descripción descripción). 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 descripción puede ser un organismo de tipo silvestre. Un organismo de referencia que contiene un locus endógeno como se describe en la presente descripción puede ser un organismo modificado genéticamente. El organismo de referencia 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 descripción se refiere a un agente o entidad de una fuente diferente. Por ejemplo, cuando se usa en referencia a un polipéptido, gen, o producto génico o presente en una célula u organismo particular, el término aclara que el polipéptido, gen, o producto génico relevante 1) se modificó por la acción del hombre; 2) se introdujo en la célula u organismo (o un precursor de este) por la acción del hombre (por ejemplo, por medio de ingeniería genética); y/o 3) no se produce o no está presente naturalmente en la célula u organismo relevante (por ejemplo, el tipo de célula o el tipo de organismo relevante).

El término "*célula huésped*", como se usa en la presente descripción, se refiere a una célula en la que 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 la célula particular en cuestión, sino que también se usan 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 descripción. Una célula huésped puede ser o puede comprender una célula procarionta o eucariota. En general, una célula huésped es cualquier célula que sea adecuada para recibir y/o producir un ácido nucleico o una proteína heterólogos, independientemente del reino de la vida al que pertenece la célula. Las células ilustrativas que pueden utilizarse como células huésped de acuerdo con la presente descripción incluyen las de organismos procariontas y eucariotas (unicelulares o pluricelulares), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., etcétera), células de micobacterias, células fúngicas, células de levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etcétera), células vegetales, células de insectos (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insectos infectadas con baculovirus, *Trichoplusia ni*, etcétera), células de animales no humanos, células humanas, o fusiones de células tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. La célula puede ser una célula humana, de mono, simio, hámster, rata, o ratón. La célula puede ser eucariota y se selecciona de las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), célula de retina, Vero, CV1, renal (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (por ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral, y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. 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 descripción 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. En algunos casos (que incluyen, por ejemplo, en los que una proteína humanizada tiene una secuencia de aminoácidos cuya secuencia completa se encuentra en una proteína humana), una proteína humanizada se expresa 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.

El término "*identidad*" como se usa en la presente descripción 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 descripción 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 descripción, 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 (en la naturaleza y/o en un entorno experimental), y/o (2) se ha diseñado, producido, preparado, y/o fabricado por la acción del hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o más de aproximadamente 99 % de los otros componentes con los que se asociaron 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 descripción 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 es una cadena oligonucleotídica o que puede 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; o un "ácido nucleico" puede ser o puede comprender ADN. Un ácido nucleico puede ser, o 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 puede ser, o 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, pirrolo-pirimidina, 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 una combinación 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, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 o más residuos de longitud. Un ácido nucleico puede ser monocatenario; 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 descripción, 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 descripción puede referirse 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 de control de la expresión pueden ser o pueden comprender secuencias de iniciación de la transcripción, de terminación, promotoras y/o potenciadoras adecuadas; señales para el procesamiento de ARN eficiente 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 procariontes, las secuencias de control incluyen típicamente promotor, sitio de unión al ribosoma, y secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotes 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 el término "secuencias de control" puede referirse a componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el 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 por la acción del hombre.

El término "*recombinante*", como se usa en la presente descripción, se destina a referirse a polipéptidos (por ejemplo, proteínas reguladoras de señales como se describe en la presente descripción) que se diseñan, modifican genéticamente, preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como polipéptidos que se expresan con el uso de un vector de expresión recombinante transfectado 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 estar compuesto por 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 descripción para referirse a un proceso a través del cual una secuencia de ácido nucleico "*reemplazada*" (por ejemplo, un gen) que se encuentra en un locus huésped (por ejemplo, en un genoma) se elimina de ese locus y un ácido nucleico diferente de "*reemplazo*", se 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 homólogas 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 una proteína codificada por la secuencia endógena (por ejemplo, la secuencia genómica endógena codifica una proteína April, y el fragmento de ADN codifica una o más proteínas APRIL 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 "*un ligando inductor de la proliferación*" o "*APRIL*" o "*April*" como se usa en la presente descripción se refiere a un ligando de la familia de necrosis tumoral, es decir, un ligando de la familia de TNF. APRIL 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. APRIL 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 algunas 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 *APRIL* humano y de ratón se proporcionan en la Tabla 3. Después de leer esta descripción los expertos reconocerán que uno o más genes *April* endógenos en un genoma (o todos) pueden reemplazarse con uno o más genes *April* heterólogos (por ejemplo, variantes polimórficas, subtipos o mutantes, genes de otras especies, formas humanizadas, etcétera).

Una "*célula que expresa APRIL*" como se usa en la presente descripción se refiere a una célula que expresa un ligando inductor de la proliferación. Una célula que expresa APRIL puede expresar un ligando inductor de la proliferación en su superficie. Una proteína APRIL puede expresarse en la superficie de la célula en una cantidad suficiente para mediar las interacciones célula a célula por medio de la proteína APRIL expresada en la superficie de la célula. Una célula que expresa APRIL puede expresar un ligando inductor de la proliferación en forma soluble (es decir, no en la superficie de una célula). Las células que expresan APRIL ilustrativas incluyen células dendríticas, macrófagos, monocitos y células T. Las células que expresan APRIL regulan la interacción de las células inmunitarias para regular las respuestas de células B a diversos antígenos extraños o patógenos, que incluyen el cambio de clase a isotipos de anticuerpo específicos. Los animales no humanos descritos en la presente descripción pueden demostrar una regulación de las células inmunitarias por medio de ligandos April humanizados expresados en la superficie de una o más células del animal no humano. Los animales no humanos descritos en la presente descripción 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 descritos en la presente descripción 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 descripción se refiere a la condición cualitativa de exhibir una medida o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en la materia biológica comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, o nunca, llegan a completarse y/o proceden a completarse o lograr o evitar un resultado absoluto. Por lo tanto el término "*sustancialmente*" se usa en la presente descripción para capturar la falta potencial de totalidad inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos.

La frase "*homología sustancial*" como se usa en la presente descripción se refiere a una comparación entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la técnica, generalmente se considera que dos secuencias son "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 "hidrofilicos", y/o con cadenas laterales "polares" o "no polares". La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo frecuentemente puede considerarse 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 mediante el uso de cualquiera de una variedad de algoritmos, que incluyen aquellos 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
Ácido aspártico	Asp	D	polar	negativo	-3.5
Cisteína	Cys	C	no polar	neutro	2.5
Ácido glutámico	Glu	E	polar	negativo	-3.5
Glutamina	Gln	Q	polar	neutro	-3.5
Glicina	Gly	G	no polar	neutro	-0.4
Histidina	His	H	polar	positivo	-3.2
Isoleucina	Ile	I	no polar	neutro	4.5
Leucina	Leu	L	no polar	neutro	3.8
Lisina	Lys	K	polar	positivo	-3.9
Metionina	Met	M	no polar	neutro	1.9
Fenilalanina	Phe	F	no polar	neutro	2.8
Prolina	Pro	P	no polar	neutro	-1.6
Serina	Ser	S	polar	neutro	-0.8
Treonina	Thr	T	polar	neutro	-0.7
Triptófano	Trp	W	no polar	neutro	-0.9
Tirosina	Tyr	Y	polar	neutro	-1.3
Valina	Val	V	no polar	neutro	4.2

Tabla 2

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

La frase "*identidad sustancial*" como se usa en la presente descripción se refiere a una comparación entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la técnica, generalmente dos secuencias se consideran "sustancialmente 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 mediante el uso de cualquiera de una variedad de algoritmos, que incluyen aquellos 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 descripción se refiere a una molécula polinucleotídica que comprende una región de transformación. Una región de transformación comprende una secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia en una célula, tejido o animal diana y proporciona la integración de la construcción de transformación en una posición dentro del genoma de la célula, tejido o animal por medio de recombinación homóloga. Se incluyen además regiones de transformación que se dirigen con el uso de sitios de reconocimiento de recombinasas sitio específicas (por ejemplo, sitios *loxP* o *Frt*). Un constructo de transformación como se describe en la presente descripción 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 como se describe en la presente descripción 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 descripción, 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. Solo 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 difiere 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 compuesto por una pluralidad de aminoácidos que tienen posiciones designadas unas con respecto a otras en el espacio lineal o tridimensional y/o que contribuyen a una función biológica particular, un ácido nucleico puede tener un elemento de secuencia característico compuesto por una pluralidad de residuos de nucleótidos que tienen posiciones designadas unas 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, una variante de polipéptido puede no compartir 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 número pequeño de alteraciones de la secuencia en posiciones particulares. Típicamente, menos de 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % de los residuos en la variante se sustituyen en comparación con el parental. 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 descripción, 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 denominan en la presente descripción "vectores de expresión."

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

Descripción detallada de determinadas modalidades

En la presente descripción se describen entre otras cosas, animales no humanos mejorados y/o modificados genéticamente que tienen material genético humanizado que codifica una proteína de ligando inductor de la proliferación (por ejemplo, APRIL). 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 *April* 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 April humanizadas y los ligandos/receptores presentes en la superficie de las células humanas injertadas. Los animales no humanos descritos en la presente descripción pueden ser 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 April humanizadas pueden tener una secuencia codificada por los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano. Los animales no humanos descritos en la presente descripción pueden comprender un gen *April* modificado genéticamente que contiene material genético del animal no humano y una especie heteróloga (por ejemplo, un ser humano). Los animales no humanos descritos en la presente descripción pueden comprender un gen *April* humanizado, en donde el gen *April* humanizado comprende los exones 2, 3, 4, 5 y 6 de un gen *APRIL* humano. La expresión de la proteína April humanizada puede encontrarse bajo el control de material genético de *April* no humano (por ejemplo, un promotor de *April* 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 forma.

Gen del ligando inductor de la proliferación (APRIL)

El ligando inductor de la proliferación (APRIL) 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 células dendríticas, células epiteliales, macrófagos, monocitos, osteoclastos y células T. APRIL (también denominado miembro 13 de la

superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral, TNFSF13, CD256, TALL-2, TALL2, TRDL-1 y ZTNF2) 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 estructura del gen para APRIL en ratón y en el hombre es similar en el hecho de que ambos genes contienen 6 exones con los dos primeros que codifican la porción transmembrana y los exones restantes que codifican la porción extracelular de la proteína. Además, en seres humanos y en ratones, el sitio de escisión de furina está codificado por el exón 2. Tanto para ratón como para el hombre, se han informado variantes de corte y empalme alternativo. En seres humanos, el corte y empalme alternativo que combina el exón 1 y el 3 genera una forma unida a membrana que es resistente a la escisión debido a la ausencia del sitio de escisión de furina codificado por el exón 2. Esta variante se ha denominado *APRIL-δ*. Se han informado otras variantes de corte y empalme alternativo que omiten el exón 3 (*APRIL-β*) o empalman un intrón críptico en el exón 6 (*APRIL-γ*). Sin embargo, estas variantes de corte y empalme no se han observado en ratones. Por el contrario, se han informado variantes de corte y empalme que son el resultado de diferencias de un aminoácido en el residuo de aminoácido 120 y solo tienen ligeras diferencias en la unión a los receptores.

El gen *APRIL* tanto en ratón como en el hombre se ubica 3' de otro gen en la superfamilia de ligandos de TNF, el inductor débil de apoptosis relacionado con TNF (*TWEAK*). De manera notable, tanto en ratón como en el hombre se ha observado un evento único de corte y empalme intergénico que produce una variante denominada TWE-PRIL. En seres humanos, este corte y empalme intergénico se produce entre el exón 6 de *TWEAK* y el exón 2 de *APRIL*, mientras que en ratones, el corte y empalme es entre el exón 7 de *TWEAK* y el exón 1 de *APRIL*. Se ha demostrado que TWE-PRIL estimula células T y B *in vitro* e induce su proliferación.

Los receptores informados para APRIL incluyen ligando de interacción de ciclofilina, activador transmembrana y modulador de calcio (TACI) y antígeno de maduración de células B (BCMA). Un ligando relacionado con la familia de TNF (BAFF) también se une a TACI y BCMA, así como a un tercer receptor BAFF-R. La unión de BAFF a BAFF-R es única para BAFF y no se comparte con APRIL.

El papel de APRIL, en particular, se ha investigado con respecto a su papel en la modulación de las respuestas de células B y T. En particular, se ha informado que APRIL estimula el crecimiento de células tumorales *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, Hahne y otros (1998, J. Exp. Med. 188(6):1185-1190) informaron que APRIL soluble aumentó la proliferación de células tumorales en cultivo en una manera dependiente de la dosis, y, cuando se transfectó como proteína de longitud completa en células tumorales, condujo a una velocidad de proliferación mayor que la de células con tratamiento simulado o de tipo silvestre.

Secuencias de APRIL

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

Tabla 3

<p>ADNc de April de ratón NM_001159505.1</p>	<p>GAAGGCTGGCCGCTCCTTCTGGGTGTACGGCTGCCCTGTC CTTCTAGATAATGGCACCAAAATTCTCCTGAGGCTAGGGGG GAAGGAGTGTGAGAGTGTCACTAGCTCGACCCTGGGGACAA GGGGGACTAATAGTACCCTAGCTTGATTTCTTCTATTCTC AAGTTCCTTTTTATTCTCCCTTGCGTAACCCGCTCTTCCC TTCTGTGCCTTTGCCTGTATTCCCACCCTCCCTGCTACCTC TTGGCCACCTCACTTCTGAGACCACAGCTGTTGGCAGGGTC CCTAGCTCATGCCAGCCTCATCTCCAGGCCACATGGGGGGC</p>
---	--

ES 2 703 549 T3

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

	<p>TCAGTCAGAGAGCCAGCCCTTTCGGTTGCTCTTTGGTTGAG TTGGGGGGCAGTTCTGGGGGCTGTGACTTGTGCTGTCGCAC TACTGATCCAACAGACAGAGCTGCAAAGCCTAAGGCGGGAG GTGAGCCGGCTGCAGCGGAGTGGAGGGCCTTCCAGAAGCA GGGAGAGCGCCCATGGCAGAGCCTCTGGGAGCAGAGTCTTG <u>ATGTCCTGGAAGCCTGGAAGGATGGGGCGAAATCTCGGAGA</u> <u>AGGAGAGCAGTACTCACCCAGAAGCACAAAGAAGAAGCACTC</u> AGTCCTGCATCTTGTTCAGTTAACATTACCTCCAAGGACT CTGACGTGACAGAGGTGATGTGGCAACCAGTACTTAGGCGT <u>GGGAGAGGCCTGGAGGCCAGGGAGACATTGTACGAGTCTG</u> <u>GGACTGGAATTTATCTGCTCTATAGTCAGTCTCTGTTTC</u> ATGATGTGACTTTCACAATGGGTCAGGTGGTATCTCGGGAA GGACAAGGGAGAAGAGAACTCTATTCCGATGTATCAGAAG TATGCCTTCTGATCCTGACCGTGCCTACAATAGCTGTACA GTGCAGGTGTCTTTCATTTACATCAAGGGGATATTACTACT <u>GTCAAATTCACGGGCAAACGCAAACTTAGCCTTTCTCC</u> <u>GCATGGAACATTCTGGGGTTTGTGAAACTATGATTGTTAT</u> <u>AAAGGGGGTGGGGATTTCCCATTCAAAAACTGGCTAGACA</u> <u>AAGGACAAGGAACGGTCAAGAACAGCTCTCCATGGCTTTGC</u> <u>CTTGACTGTTGTTCCCTCCCTTTGCCTTTCCCGCTCCCATA</u> <u>TCTGGGCTTTGACTCCATGGATATTAATAAAGTAGAATATT</u> <u>TTGTGTTTATCTCCACACAGCCCCAAATCTTTTGTGTG</u> <u>TGTGCGAAGGGGGTTTTGCGCACTGTGCCAAGCCTTGTTCA</u> <u>CTGGAATGCATCCAGAACAGCAGCACCATCTAGCGGCAGGT</u> <u>TGAGGAAAGACTATGGTCTCTGCTAGGGAAAACCTTATCCA</u> <u>ACTCTTCAAGTACCCTCTGCTTCAATTAACAAGAAGCCCGG</u> <u>CTTTCAGTATTTACCTATTGCGTCCAAATCTTTGTTACTA</u> <u>TCTAGAAAAAGATATATGTTAGGTGCCCTCGATATGCATGCC</u> <u>ATTCATCCTCCCCATTCTCCTATACACTTCCGAGCTGGGCA</u> <u>CTGAGCTTTACGCCTTAAATCACAGTACTCGGGAGGCAGAT</u> <u>CTCGATGAGTTCGAGGCCAACTTGGTCTAAATAGTGAGTTC</u> <u>CAGGCCACCCAGGGGTTACAATGGTGAGACCCTGTCTCAAAA</u> <u>CAAATAACAACAATAAACGAAAGGCTCTCCACG</u></p> <p>(Sec. con núm. de ident.: 1)</p>
<p>Proteína April de ratón NP_001152977.1</p>	<p>MPASSPGHMGGSVREPALSVALWLSWGA VLGA VTCVALLI QQTELQSLRREVSRLQ RSGGPSQKQGERPWQSLWEQSPDVL EAWKDGAKSRRRRRAVLTQKHKKKH SVLHLV PVNITSK DSDV TEVMWQPVLRRRGRGLEAQGDIVRVWDTGIYLLYSQVLFHDV TFTMGQVVSREGQGRRETLFRCIRSMPSDPDRAYNSCYSAG VFHLHQGDII TVKI PRANAKLSLS PHGTFLGFVKL</p> <p>(Sec. con núm. de ident.: 2)</p>
<p>Proteína TWE-PRIL de ratón NP_001152975.1</p>	<p>MAARRSQRRRGRGEPGTALLAPLVLSLGLALACLGLLLVV VSLGSWATLSAQEPSQEELTAEDRREPPELNPQTEESQDVV PFLEQLVRRPRRSAPKGRKARPRRAIAAHYEVHPRPGDGAQ AGVDGTVSGWEETKINSSSPLRYDRQIGFTVIRAGLYYLY CQVHFDEGKAVYLLKLDLLVNGVLALRCLEEFSAATAASSPGP QLRLCQTELQSLRREVSRLQ RSGGPSQKQGERPWQSLWEQS PDVLEAWKDGAKSRRRRRAVLTQKHKKKH SVLHLV PVNITSK DSDVTEVMWQPVLRRRGRGLEAQGDIVRVWDTGIYLLYSQVLF HDVTFMGQVVSREGQGRRETLFRCIRSMPSDPDRAYNSC YSAGVFHLHQGDII TVKI PRANAKLSLS PHGTFLGFVKL</p> <p>(Sec. con núm. de ident.: 3)</p>

<p>ADNc de APRIL humano NM_003808.3</p> <p>5</p> <p>10</p> <p>15</p> <p>20</p> <p>25</p> <p>30</p> <p>35</p> <p>40</p> <p>45</p> <p>50</p> <p>55</p>	<p>CCGGAACCCCTGTGTGCTGGGGAGGAATCCCGCAGTGGCCGG GGGGCTTGAGGCCGCTGCTTTGTCTCTTCGTCCAGAGCCTT ATGTAAGAGCTTTTCTCGGGAAACAGGAAGTCTGCTTGCC AATTTACAGCACAGGGAGTAGTGCAGGCCTTATTTCCAACACA CCCGGCCAGCCTTAACCCAGAACTCAGCCAGTTTCTTGC TTCCGTGCCCTGGTTCTCCTCCCCATCGAGCCCACCCCTC CTTTCCACCTTCAGTCACCCCTAGTGAAGTCCCCAGCGA TCTCTGCTGTGCTTGACCCCGAGGGTCTCCACCCTCGCCC TGACCCTGGACACTGCCAGCTTGGCCCCCATCCTGCTCC TGGACAATGCCCTCTAGCCAGCCAACCTTCCCTCCCCAA CCCTGGGGCCGCCAGGGTTCCTGCGCACTGCCTGTTCTCT CCTGGGTGTCACTGGCAGCCCTGTCTTCTTAGAGGGACTG GAACCTAATTCTCCTGAGGCTGAGGGAGGGTGGAGGGTCTC AAGGCAACGCTGGCCCCACGACGGAGTGCCAGGAGCACTAA CAGTACCCTTAGCTTGCTTTCTCCTCCCTCCTTTTTATTT TCAAGTTCCTTTTTATTTCTCCTTGCGTAACAACCTTCTTC CCTTCTGCACCACTGCCCGTACCCTTACCCGCCCCGCCACC TCCTTGCTACCCCACTCTTGAAACCACAGCTGTTGGCAGGG TCCCAGCTCATGCCAGCCTCATCTCCTTTCTTGCTAGCCC CCAAAGGGCCTCCAGGCAACATGGGGGGCCAGTCAGAGAG CCGGCACTCTCAGTTGCCCTCTGGTTGAGTTGGGGGGCAGC TCTGGGGCCGTGGCTTGTGCCATGGCTCTGCTGACCCAAC AAACAGAGCTGCAGAGCCTCAGGAGAGAGGTGAGCCGGCTG CAGGGGACAGGAGGCCCTCCAGAAATGGGGAAGGGTATCC CTGGCAGAGTCTCCCGGAGCAGAGTCCGATGCCCTGGAAG CCTGGGAGAATGGGGAGAGATCCCGGAAAAGGAGAGCAGTG CTCACCCAAAAACAGAAGAAGCAGCACTCTGTCTGCACCT GGTCCCATTAAACGCCACCTCCAAGGATGACTCCGATGTGA CAGAGGTGATGTGGCAACCAGCTCTTAGGCGTGGGAGAGGC CTACAGGCCCAAGGATATGGTGTCCGAATCCAGGATGCTGG AGTTTATCTGCTGTATAGCCAGGTCTGTTTCAAGACGTGA CTTTCACCATGGGTGAGGTGGTGTCTCGAGAAGGCCAAGGA AGGCAGGAGACTCTATTCCGATGTATAAGAAGTATGCCCTC CCACCCGGACCGGGCCTACAACAGCTGCTATAGCGCAGGTG TCTTCCATTTACACCAAGGGGATATTCTGAGTGTATAAAT CCCCGGGCAAGGGCGAACTTAACCTCTCTCCACATGGAAC CTTCTGGGGTTTGTGAACTGTGATTGTGTTATAAAAAGT GGCTCCAGCTTGAAGACCAGGGTGGGTACATACTGGAGA CAGCCAAGAGCTGAGTATATAAAGGAGAGGGAATGTGCAGG AACAGAGGCGTCTTCTGGGTTTGGCTCCCCGTTCTCACT TTTCCCTTTTCACTCCACCCCTTAGACTTTGATTTTACGG ATATCTTGCTTCTGTTCCCATGGAGCTCCGAATTCTTGCG TGTGTGTAGATGAGGGGCGGGGACGGGCGCCAGGCATTGT CCAGACCTGGTCCGGGCCACTGGAAGCATCCAGAACAGCA CCACCATCTAGCGGCCGCTCGAGGGAAGCACCCGCCGGTTG GCCGAAGTCCACGAAGCCGCCCTCTGCTAGGGAACCCCT GGTCTCCATGCCACACTCTCTCCAGGTGCCCTCTGCCTC TTCACCCCAACAAGAAGCCTTATCCTACGTCTCTCTCCAT CTATCGGACCCAGTTTCCATCACTATCTCCAGAGATGTAG CTATTATGCGCCCGTCTACAGGGGGTGGCCGACGATGACGG TGCCTTCGCAGTCAAATTACTCTTCGGGTCCCAAGGTTTGG CTTTCACGCGCTCCATTGCCCGGCGTGGCAGGCCATTCCA AGCCCTTCCGGGCTGGAAGTGGTGTCCGAGGAGCCTCGGGT</p>
<p>60</p> <p>65</p>	<p><u>GTATCGTACGCCCTGGTGTGGTGTGCCTCACTCCTCTGA</u> <u>GCTCTTCTTTCTGATCAAGCCCTGCTTAAAGTAAATAAAA</u> <u>TAGAATGAATGATACCCCGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA</u></p> <p>(Sec. con núm. de ident.: 4)</p>

5	Proteína APRIL humana NP_003799.1	MPASSPFLAPKGGPPGNMGGPVREPALSVALWLSWGAALGAVACAMALLTQQTELEQSLRREVSRLQGTGGPSQNGEGYPWQSLPEQSSDALEAWENGERSRKRRAVLTQKQKQHSVLHLVPI NATSKDDSDVTEVMWQPALRRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRFCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVII PRARAKLNLSPHGTFLGFVKL (Sec. con núm. de ident.: 5)
10		
15	Proteína APRIL-β humana NP_742084.1	MPASSPFLAPKGGPPGNMGGPVREPALSVALWLSWGAALGAVACAMALLTQQTELEQSLRREVSRLQGTGGPSQNGEGYPWQSLPEQSSDALEAWENGERSRKRRAVLTQKQKNDSDVTEVMWQPALRRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRFCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVII PRARAKLNLSPHGTFLGFVKL (Sec. con núm. de ident.: 6)
20		
25	Proteína APRIL-γ humana NP_742085.1	MPASSPFLAPKGGPPGNMGGPVREPALSVALWLSWGAALGAVACAMALLTQQTELEQSLRREVSRLQGTGGPSQNGEGYPWQSLPEQSSDALEAWENGERSRKRRAVLTQKQKQHSVLHLVPI NATSKDDSDVTEVMWQPALRRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRFCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVII PRARAKLNLSPHGTFLGFVKL (Sec. con núm. de ident.: 7)
30		
35	Proteína APRIL-δ humana NP_001185551.1	MPASSPFLAPKGGPPGNMGGPVREPALSVALWLSWGAALGAVACAMALLTQQTELEQSLRREVSRLQGTGGPSQNGEGYPWQSLPEQHSVLHLVPI NATSKDDSDVTEVMWQPALRRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRFCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVII PRARAKLNLSPHGTFLGFVKL (Sec. con núm. de ident.: 8)
40		
45	Proteína APRIL-ζ humana NP_001185552.1	MPASSPFLAPKGGPPGNMGGPVREPALSVALWLSWGAALGAVACAMALLTQQTELEQSLRREVSRLQGTGGPSQNGEGYPWQSLPEQHSVLHLVPI NATSKDDSDVTEVMWQPALRRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRFCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVII PRARAKLNLSPHGTFLGFVKL (Sec. con núm. de ident.: 9)
50		
55	Proteína APRIL-η humana NP_001185553.1	MGGPVREPALSVALWLSWGAALGAVACAMALLTQQTELEQSLRREVSRLQGTGGPSQNGEGYPWQSLPEQHSVLHLVPI NATSKDDSDVTEVMWQPALRRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRFCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVII PRARAKLNLSPHGTFLGFVKL (Sec. con núm. de ident.: 10)
60	Proteína TWE-PRIL humana NP_742086.1	MAARRSQRRRGRGEPGTALLVPLALGLGLALACLGLLLAVVSLGSRASLSAQEPAQEELVAEEDQDPSELNPQTEESQDPA PFLNRLVRRSAPKGRKTRARRAIAAHYEVHPRPGDGAQAGVDGTVSGWEEARINSSSPLRYNRQIGEFIVTRAGLYLY

5	<p>CQSSDALEAWENGENERSRKRRAVLTQKQKKQHSLVHLVLPINA TSKDDSDVTEVMWQPALRRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLY SQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRICIRSMPSHPDRA YNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHGTFLGFV KL</p> <p>(Sec. con núm. de ident.: 11)</p>
10	<p>Proteína April humanizada</p> <p>MPASSPGHMGGSVREPALSVALWLSWGAVALGAVTCAVALLI QQTEHQSLRREVSRLQRSGGPSQKQGERPWQSLWEQSSDAL EAWENGENERSRKRRAVLTQKQKKQHSLVHLVLPINATSKDDSD VTEVMWQPALRRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD VTFTMGQVVSREGQGRQETLFRICIRSMPSHPDRAYNSCYS A GVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHGTFLGFVKL</p> <p>(Sec. con núm. de ident.: 12)</p>
15	
20	

Animales no humanos con April humanizada

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

Un gen *April* modificado genéticamente puede comprender material genético de una especie heteróloga (por ejemplo, seres humanos), en donde el gen *April* modificado genéticamente codifica una proteína April que comprende la porción codificada del material genético de la especie heteróloga. Un gen *APRIL* modificado genéticamente descrito en la presente descripción puede comprender ADN genómico de una especie heteróloga que corresponde a la porción extracelular de una proteína April 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 *April* modificado genéticamente.

Un gen *April* endógeno puede eliminarse. Un gen *April* endógeno puede alterarse, en donde una porción de un gen *April* endógeno se reemplaza con una secuencia heteróloga (por ejemplo, una secuencia del gen *APRIL* humano, en su totalidad o en parte). La totalidad o sustancialmente la totalidad del gen *April* endógeno puede reemplazarse con un gen heterólogo (por ejemplo, un gen *APRIL* humano). Una porción de un gen *APRIL* heterólogo puede insertarse en un gen *April* endógeno no humano. El gen heterólogo puede ser un gen humano.

Un animal no humano como se describe en la presente descripción puede contener un gen *APRIL* humano, en su totalidad o en parte, en un locus *April* endógeno no humano. Por lo tanto, tales animales no humanos pueden describirse como que tienen un gen *April* humanizado. El gen *April* endógeno reemplazado, insertado o modificado (es decir, el gen *April* 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.

Un gen *April* humanizado puede incluir un gen *April* que tiene un segundo, 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 segundo, tercer, cuarto, quinto, y sexto exón que aparece en un gen *APRIL* humano de la Tabla 3.

Un gen *April* humanizado puede incluir un gen *April* 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 1007 - 2276 que aparecen en una secuencia de ADNc de *APRIL* humano de la Tabla 3.

Una proteína April humanizada producida por un animal no humano como se describe en la presente descripción 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 *APRIL* humana que aparece en la Tabla 3.

Una proteína April humanizada producida por un animal no humano como se describe en la presente descripción 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 87 a 250 que aparecen en una proteína APRIL humana de la Tabla 3.

Una proteína April humanizada producida por un animal no humano como se describe en la presente descripción 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 APRIL humanizada que aparece en la Tabla 3.

Una proteína April humanizada producida por un animal no humano como se describe en la presente descripción 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 APRIL humana que aparece en la Tabla 3.

Se proporcionan composiciones y métodos para producir animales no humanos que expresan una proteína April 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 APRIL humana, en su totalidad o en parte, en una ubicación precisa en el genoma de un animal no humano que corresponde a un gen *April* endógeno para crear de este modo un gen *April* humanizado que expresa una proteína April que es humana, en su totalidad o en parte. Los métodos pueden incluir insertar el ADN genómico correspondiente a los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano en un gen *April* endógeno del animal no humano para crear de este modo un gen humanizado que codifica una proteína APRIL que contiene una porción humana que contiene los aminoácidos codificados por los exones insertados.

Un enfoque de gen *April* humanizado puede emplear una modificación relativamente mínima del gen endógeno y puede dar como resultado la transducción de señales natural mediada por APRIL en el animal no humano dado que la secuencia genómica del gen *APRIL* 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 *April* no afecta a otros genes cercanos u otros genes *April* endógenos. Además, la modificación puede no afectar el ensamblaje de una proteína transmembrana funcional en la membrana plasmática y puede mantener 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.

Una ilustración esquemática (no a escala) de los genes *APRIL* endógenos murino y humano se proporciona en la Figura 1. Una ilustración esquemática (no a escala) de un gen *April* humanizado se proporciona en la Figura 2B. Como se ilustra, el ADN genómico que contiene los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano se inserta en un gen *April* 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 87 a 250) de una proteína APRIL humana responsable de la unión al receptor.

Un animal no humano (por ejemplo, un ratón) que tiene un gen *April* humanizado puede producirse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede producirse un vector de transformación que introduce un gen *APRIL* humano, en su totalidad o en parte, con un gen marcador de selección. La Figura 2A ilustra las etapas iniciales de la construcción de un vector de transformación ilustrativo que comprende los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano y un casete de neomicina 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) posicionado 3' de los exones humanos. La Figura 2B ilustra un genoma de ratón que comprende una inserción de los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano con el uso de un vector de transformación ilustrativo descrito en la Figura 2A. Como se ilustra, el constructo de transformación contiene regiones de homología en 5' y 3' únicas que permiten la inserción precisa del material genético humano que comprende los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano por recombinación homóloga. El constructo de transformación contiene además un casete de selección por fármaco autoeliminable, que se posiciona 3' del material genético que comprende los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano. Tras la recombinación homóloga, los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano se insertan en un gen *April* endógeno murino que se ha modificado específicamente para aceptar la secuencia humana contenida en el vector de transformación. Se crea un gen *April* humanizado lo que da como resultado una célula o animal no humano que expresa una proteína April humanizada que contiene los aminoácidos codificados por los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* 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 *April* humanizado descrito anteriormente liberarán el marcador de selección de las células diferenciadas durante el desarrollo.

Los animales no humanos como se describe en la presente descripción pueden prepararse como se describió

5 anteriormente, o con el uso de métodos conocidos en la técnica, de modo que comprendan genes humanos o humanizados adicionales, lo que depende frecuentemente del uso previsto del animal no humano. El material genético de tales genes humanos o humanizados adicionales puede introducirse a través de la alteración adicional del genoma de las células (por ejemplo, células madre embrionarias) que tienen las modificaciones genéticas como se describió
 10 anteriormente o a través de técnicas de cruzamiento conocidas en la técnica con otras cepas modificadas genéticamente según convenga. Los animales no humanos descritos en la presente descripción 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 descripción pueden prepararse de modo que comprendan además un gen de factor activador de células B (*BAFF*) humano o humanizado. Los animales no humanos como se describe en la presente descripción 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 descripción pueden comprender un gen *April* humanizado como se describe en la presente descripción 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*, *BAFF* y *TWEAK*.

15 Además de ratones que tienen genes *April* humanizados como se describe en la presente descripción, en la presente descripción se proporcionan además otros animales no humanos modificados genéticamente que comprenden genes *APRIL* humanizados. Tales animales no humanos pueden comprender un gen *April* humanizado unido operativamente a una secuencia promotora de *April* endógeno. Tales animales no humanos pueden expresar una proteína *April* humanizada a partir de un locus *April* endógeno, en donde la proteína *April* humanizada comprende los residuos de aminoácidos 87 a 250 de una proteína *APRIL* humana.

20 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, primate (por ejemplo, tití, mono rhesus). Para los animales no humanos donde no se dispone fácilmente de células ES modificables genéticamente adecuadas, se emplean otros métodos para producir un animal no humano que comprende las modificaciones genéticas como se describe en la presente descripción. Tales métodos incluyen, por ejemplo, la modificación de un genoma de células que no son ES (por ejemplo, un fibroblasto o una célula pluripotente inducida) y el empleo de la transferencia nuclear para transferir el genoma modificado a una célula adecuada, por ejemplo, un ovocito, y la gestación de la célula modificada (por ejemplo, el ovocito modificado) en un animal no humano en condiciones adecuadas para formar un embrión.

25 Un animal no humano como se describe en la presente descripción puede ser un mamífero. Un animal no humano como se describe en la presente descripción puede ser un mamífero pequeño, por ejemplo, de la superfamilia Dipodoidea o Muroidea. Un animal modificado genéticamente como se describe en la presente descripción puede ser un roedor. Un roedor como se describe en la presente descripción puede seleccionarse de un ratón, una rata, y un hámster. Un roedor como se describe en la presente descripción puede seleccionarse de la superfamilia Muroidea. Un animal modificado genéticamente como se describe en la presente descripción 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 descripción 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 descripción puede ser un miembro de la familia Muridae. Un animal no humano como se describe en la presente descripción puede ser un roedor. Un roedor como se describe en la presente descripción puede seleccionarse de un ratón y una rata. Un animal no humano como se describe en la presente descripción puede ser un ratón.

35 Un animal no humano como se describe en la presente descripción 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 descripción 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 descripción 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 descripción puede ser una mezcla de las cepas 129 mencionadas anteriormente, o una mezcla de las cepas BL/6 mencionadas anteriormente. Una cepa 129 de la mezcla como se describe en la presente descripción puede ser una cepa 129S6 (129/SvEvTac). Un ratón como se describe en la presente descripción puede ser una cepa BALB, por ejemplo, la cepa BALB/c. Un ratón como se describe en la presente descripción puede ser una mezcla de una cepa BALB y otra cepa mencionada anteriormente.

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

5 Métodos que emplean animales no humanos que tienen genes APRIL humanizados

Se han informado animales no humanos (por ejemplo, ratones) transgénicos y con desactivación génica para *April* (Stein y otros, 2002, *J. Clin. Invest.*, 109(12):1587-1598; Castigli y otros, 2004, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 101(11):3903-3908; Xiao y otros, 2008, *Eur. J. Immunol.*, 38(12):3450-3458). Tales animales se han empleado en una variedad de ensayos para determinar los aspectos moleculares de la expresión, función y regulación de APRIL. Sin embargo, no lo han sido sin limitación. Por ejemplo, el uso de ratones transgénicos para *April* ha sido limitado debido a los patrones de expresión específicos del transgén, que pueden atribuirse de manera razonable al diseño de la construcción. Por otra parte, en tales ratones transgénicos, se observó expresión de *April* detectable solo para dos de cuatro líneas transgénicas, pero solo en células T y no en otro tipo de célula. Los ratones transgénicos que expresan APRIL humana han producido resultados que contradicen los estudios previos. Por ejemplo, los ratones que recibieron varias inyecciones de APRIL humana recombinante demostraron una activación completa de células T, mientras que los ratones transgénicos que expresan APRIL humana no lograron lo mismo. Si bien se ha demostrado la utilidad de los ratones transgénicos para *April* para dilucidar algunas funciones biológicas mediadas por APRIL, estos han demostrado variabilidad en los resultados obtenidos, que se basan, al menos en parte, en los diferentes enfoques empleados para producirlos. Por lo tanto, los sistemas *in vivo* actuales que explotan la biología mediada por APRIL son incompletos. Los aspectos moleculares de la función biológica y las vías de señalización mediadas por APRIL no se han explotado en ratones transgénicos en todo su potencial.

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

Los animales no humanos como se describe en la presente descripción pueden usarse para medir el efecto terapéutico de bloquear o modular la transducción de señales de APRIL 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 descripción pueden usarse para medir el efecto terapéutico de bloquear o modular las vías de señalización de APRIL-TACI y/o APRIL-BCMA humanas, por ejemplo, la modulación de la transcripción del ADN mediada por NF-κB. Un animal no humano como se describe en la presente descripción o células aisladas de este pueden exponerse a un producto terapéutico candidato que se une a una proteína APRIL 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 APRIL, por ejemplo, la estimulación de células B y T, la estimulación del crecimiento tumoral, la supervivencia a largo plazo de células B específicas de antígeno (por ejemplo, células plasmáticas), y la activación de NF-κB.

Los animales no humanos como se describe en la presente descripción pueden expresar la proteína *April* humanizada, por lo tanto pueden generarse células, líneas celulares, y cultivos de células de modo que sirvan como fuente de *April* humanizada para usar en ensayos de unión y funcionales, por ejemplo, para ensayar la unión o función de un antagonista o un agonista de APRIL, particularmente cuando el antagonista o el agonista es específico para una proteína APRIL humana o epítipo de esta. Una proteína *April* humanizada expresada por un animal no humano como se describe en la presente descripción puede comprender una variante de secuencia de aminoácidos. Se han informado variantes de proteínas APRIL humanas que tienen variaciones asociadas con los residuos de unión al ligando. Los animales no humanos como se describe en la presente descripción pueden expresar una variante de proteína *April* humanizada. La variante puede ser polimórfica en una posición de aminoácido asociada con la unión al ligando. Los animales no humanos como se describe en la presente descripción pueden usarse para determinar el efecto de la unión al ligando a través de la interacción con una variante polimórfica de APRIL humana. Los animales no humanos como se describe en la presente descripción pueden expresar una variante de corte y empalme alternativo de APRIL humana. Los animales no humanos como se describe en la presente descripción pueden expresar una variante de corte y empalme de la proteína APRIL humana que aparece en la Tabla 3.

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 descripción 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 descripción pueden immortalizarse y mantenerse en cultivo indefinidamente (por ejemplo, en cultivos en serie).

- 5 Las células y/o los animales no humanos como se describe en la presente descripción pueden usarse en un ensayo de supervivencia y/o proliferación (por ejemplo, con el empleo de células B o T) para seleccionar y desarrollar productos terapéuticos candidatos que modulan APRIL 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 APRIL candidatos (por ejemplo, antagonistas) pueden identificarse, caracterizarse y desarrollarse con el uso de células de animales no humanos como se describe en la presente descripción y/o un animal no humano como se describe en la presente descripción. Las células y/o los animales no humanos como se describe en la presente descripción pueden usarse en un ensayo de supervivencia para determinar la cantidad de células B plasmáticas específicas de antígeno en presencia y ausencia de APRIL.
- 10 Las células y/o los animales no humanos como se describe en la presente descripción pueden usarse en diversos regímenes de inmunización para determinar las funciones mediadas por APRIL en la respuesta inmunitaria a un antígeno. Los productos terapéuticos candidatos que se unen, o bloquean una o más funciones de, APRIL humana pueden caracterizarse en un animal no humano como se describe en la presente descripción. 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 descripción pueden usarse para caracterizar las funciones mediadas por APRIL 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, ovoalbúmina u OVA). El antígeno puede ser una diana asociada con una enfermedad o afección que padecen uno o más pacientes humanos que necesitan tratamiento.
- 15 20 Los animales no humanos como se describe en la presente descripción 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 APRIL humana. La producción de autoanticuerpos contra ADN bicatenario (ADNbc) en los animales no humanos como se describe en la presente descripción puede ser el resultado de una o más enfermedades o afecciones autoinmunitarias inducidas en el animal no humano.
- 25 30 Las células y/o los animales no humanos como se describe en la presente descripción 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 descripción. El potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de APRIL del repertorio de células B puede caracterizarse y/o desarrollarse en un animal no humano como se describe en la presente descripción.
- 35 40 Los animales no humanos como se describe en la presente descripción 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 APRIL 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.
- 45 Los animales no humanos como se describe en la presente descripción 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 APRIL de linfocitos nuevos y su función inmunológica. Los animales no humanos como se describe en la presente descripción pueden trasplantarse con células B humanas.
- 50 Las células de los animales no humanos como se describe en la presente descripción pueden usarse en ensayos de células T para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de APRIL 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.
- 55 Las células de los animales no humanos como se describe en la presente descripción 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 APRIL.
- 60 Una enfermedad o afección autoinmunitaria puede inducirse en uno o más animales no humanos como se describe en la presente descripción para proporcionar un sistema *in vivo* para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de APRIL 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).
- 65 Los animales no humanos como se describe en la presente descripción 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 descripción, 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. Tales fármacos o vacunas pueden mejorarse y/o desarrollarse en tales animales no humanos.

Los animales no humanos como se describe en la presente descripción pueden proporcionar 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 descripción 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 dentro del animal no humano. La proliferación, crecimiento, etcétera, de células tumorales puede medirse antes y después de la administración del 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 descripción 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 descripción 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 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 APRIL humana sin competencia con APRIL 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.

Los animales no humanos como se describe en la presente descripción 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 descripción pueden proporcionar un mejor desarrollo y mantenimiento de las células madre humanas dentro del animal no humano. Puede observarse 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 descripción pueden proporcionar un aumento en el nivel de injerto de células madre hematopoyéticas humanas en comparación con animales no humanos que expresan APRIL tanto endógena no humana como heteróloga (por ejemplo, humana).

Los animales no humanos como se describe en la presente descripción proporcionan 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 descripción 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 descripción pueden proporcionar un aumento en el nivel de injerto de células B humanas en comparación con animales no humanos que expresan April endógena no humana.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos en la materia cómo producir y usar 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.

Ejemplo 1. Humanización de un gen de ligando inductor de la proliferación (APRroliferation-Inducing Ligand, *April*) endógeno no humano

Este ejemplo ilustra métodos ilustrativos para humanizar un gen endógeno que codifica el ligando inductor de la proliferación (A Proliferation-Inducing Ligand, *April*) en un animal no humano tal como un roedor (por ejemplo, un ratón). Se conoce que el *APRIL* humano existe en varias formas variantes (o alélicas). Los métodos descritos en este ejemplo pueden emplearse para humanizar un gen *April* 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 *APRIL* humano que aparece en el ensamblaje de genoma humano (GRCh37) se emplea para humanizar un gen *April* endógeno de un ratón.

Un vector de transformación para la humanización de una región extracelular de un gen *April* 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 *April* endógeno de un ratón se expone en la Figura 2A y la 2B.

Brevemente, un fragmento de ADN de ~2293 pb que contiene los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano se produjo

- mediante síntesis de ADN *de novo* (Blue Heron Biotech). Un polienlazador único, que contenía los sitios de reconocimiento de restricción AsiSI, AgeI, y MluI, se usó para modificar el extremo 3' de la secuencia del gen *APRIL* humano. El fragmento de ADN incluía además secuencias de ratón flanqueantes en 5' y 3' correspondientes al intrón 1 y la 3' UTR de un gen *April* de ratón, respectivamente. Por separado, un casete de neomicina autoeliminable flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasa (por ejemplo, *LoxP*; ver las patentes U.S. 8,354,389 y U.S. 8,518,392) de un plásmido pFHa0019 se modificó de modo que contenía sitios de restricción AsiSI y MluI únicos en los extremos 5' y 3' del casete, respectivamente. El fragmento de ADN que contiene los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano flanqueados por las secuencias del gen *April* de ratón y el casete de neomicina autoeliminable se digirieron por separado con AsiSI y MluI para producir fragmentos cohesivos compatibles. Los fragmentos se ligaron entre sí para insertar el casete autoeliminable entre el exón 6 de *APRIL* humano y la secuencia de ratón flanqueante en 3' que contiene parte de la 3' UTR de un gen *April* de ratón. Los clones bacterianos positivos se seleccionaron con ampicilina (del vector pUC) y neomicina (SDC). Los fragmentos ligados correctamente se confirmaron por PCR y mapeo de restricción.
- Por separado, un clon de BAC de ratón BMQ-223f24 (Invitrogen) se modificó específicamente para insertar el fragmento de ADN modificado que contiene los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano descrito anteriormente por recombinación homóloga en células bacterianas. El fragmento de ADN que contiene los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano se linealizó por digestión con HindIII. El fragmento linealizado se usó después para reemplazar la secuencia de ratón correspondiente en el clon de BAC BMQ-223f24 por recombinación homóloga en células bacterianas. Los clones positivos que contienen una delección de ~1776 pb de los exones 2 a 6 de *April* de ratón se seleccionaron con el uso de cloranfenicol y neomicina. El vector de transformación final contenía, de 5' a 3', la secuencia genómica de ratón que incluye un gen *Tweak* (*Tnfsf12*) de ratón y la secuencia 5' de un gen *April* de ratón, un exón 1 de *April* de ratón, ~100 pb del intrón 1 de un gen *April* de ratón, ~202 pb del intrón 1 de un gen *APRIL* humano, los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano, ~126 pb de la secuencia humana 3' del exón 6 de un gen *APRIL* humano, un casete de neomicina autoeliminable flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasa *LoxP*, la secuencia genómica de ratón que incluye la 3' UTR de un gen *April* de ratón que incluye ~83 pb 3' del codón de terminación que aparece en un gen *April* de ratón, la secuencia genómica de ratón que incluye ~350 pb corriente abajo de un gen *April* de ratón y corriente arriba de un gen *Senp3* de ratón, y un gen *Senp3* de ratón.
- El vector de transformación final se usó para electroporar células madre embrionarias de ratón (ES)BALB-*Rag2*^{-/-}*IL2Rγc*^{-/-}(DKO) para crear células ES modificadas que comprenden un gen *April* en un locus *April* endógeno que se encuentra humanizado desde aproximadamente la mitad del intrón 1 de un gen *April* de ratón (~100 pb 3' del sitio donante de corte y empalme) hasta aproximadamente 100 pb 3' del sitio de poliadenilación de un gen *APRIL* humano que se insertó en aproximadamente la mitad de la 3' UTR de un gen *April* de ratón (Figura 2B). Las células ES transformadas positivamente que contienen un gen *April* humanizado se identificaron mediante un ensayo (Valenzuela y otros, *más arriba*) que detectó la presencia de la secuencia del gen *APRIL* humano y confirmó la pérdida de las secuencias de *April* de ratón. La Tabla 4 expone los cebadores y sondas que se usaron para confirmar la humanización de un gen *April* endógeno como se describió anteriormente. h*APRIL*: *APRIL* humano; m*April*: *April* 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 2 a 6 de un gen *APRIL* humano en un gen *April* endógeno de un ratón. Los ratones que tienen la humanización de los exones 2 a 6 de un gen de *April* 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 *APRIL* humano. Las crías se genotipan y las cohortes de animales heterocigotos para la construcción del gen *April* humanizado se seleccionan para su caracterización.
- Alternativamente, la humanización de una región extracelular de un gen *April* puede realizarse mediante modificación directa de clones de BAC por recombinación homóloga sin síntesis de ADN *de novo* como se describió anteriormente. Para este método, un gen *APRIL* humano que aparece en el clon de BAC humano CTD-2126o8 puede emplearse para humanizar un gen *April* endógeno de un ratón.
- Brevemente, un clon de BAC humano CTD-2126o8 (Invitrogen) se modificó para eliminar una región 3' del gen *APRIL* humano que incluía un gen *SEN3* humano que comenzaba a aproximadamente 350 pb 3' del gen *APRIL* humano. La modificación se realiza por recombinación homóloga en células bacterianas con el uso de un vector de transformación linealizado (por ejemplo, pFHa0019) 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 brazo de homología en 5' del vector de transformación incluye la secuencia genómica que se ubica entre los genes *APRIL* y *SEN3* humanos del clon de BAC humano. El brazo de homología en 3' del vector de transformación incluye la secuencia de la cadena principal del vector BAC. El clon de BAC humano modificado que resulta de la recombinación homóloga con el vector de transformación se expone en la Figura 3A. Las colonias bacterianas con resistencia doble a cloranfenicol/neomicina se seleccionan y se cultivan para la preparación del ADN de BAC modificado que contiene una delección de un gen *SEN3* humano. Los clones de BAC modificados correctamente se confirman por PCR y secuenciación.

Se manera similar, el clon de BAC humano CTD-2126o8 modificado (descrito anteriormente) se modifica en un segunda etapa para eliminar un gen *TWEAK* humano en 5' contenido en el clon de BAC humano. El vector de transformación se construye de modo que incluya un brazo de homología en 5' que contiene la secuencia del vector BAC corriente arriba de un marcador de selección en la cadena principal del vector BAC (por ejemplo, cloranfenicol).

5 Esto permite la selección fácil de los clones de BAC resultantes con transformación doble por pérdida de la resistencia proporcionada por el marcador de selección de la cadena principal del vector BAC (por ejemplo, cloranfenicol) y ganancia de la resistencia del marcador de selección diferente en el vector de transformación. Un marcador de selección ilustrativo empleado en la presente descripción es espectinomicina. El vector de transformación se modifica con un brazo de homología en 3' que contiene un sitio de restricción único (por ejemplo, I-CeuI) y la secuencia de ADN genómico humano correspondiente al intrón 1 de un gen *APRIL* humano. Un vector de transformación, representado como pSVi0029 en la Figura 3A, se emplea en la recombinación homóloga en células bacterianas para crear un clon de BAC humano con transformación doble que contiene delecciones de un gen *TWEAK* humano, el exón 1 de un gen *APRIL* humano, y un gen *SENP3* humano. Las células bacterianas resultantes que contienen el clon de BAC humano con transformación doble adecuada son resistentes a espectinomicina/neomicina. El vector de transformación final con *APRIL* humano contiene, de 5' a 3', un casete de espectinomicina, un sitio I-CeuI, ~202 pb del intrón 1 de un gen *APRIL* humano, los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano, ~126 pb de la secuencia humana 3' del exón 6 de un gen *APRIL* humano, un casete de neomicina autoeliminable flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasa *LoxP*, y un sitio AsiSI.

20 Por separado, un clon de BAC de ratón BMQ-223f24 (Invitrogen) se modifica específicamente para eliminar la secuencia genómica de ratón que contiene los exones 2 a 6 de un gen *April* de ratón por recombinación homóloga en células bacterianas. Un vector de transformación ilustrativo puede incluir un casete de selección que es diferente (por ejemplo, higromicina) al marcador de selección presente en el clon de BAC (por ejemplo, cloranfenicol). El vector de transformación que contiene, por ejemplo, un casete de higromicina se modifica de modo que se añadan brazos de homología en 5' y 3' que contienen la secuencia genómica de ratón correspondiente al intrón 1 de ratón y la secuencia que incluye la 3' UTR de un gen *April* de ratón que incluye ~83 pb 3' del codón de terminación que aparece en un gen *April* de ratón, respectivamente. El vector de transformación se modifica además de modo que contenga sitios de restricción únicos (por ejemplo, I-CeuI y AsiSI) en los extremos 5' y 3' del casete de selección. Un vector de transformación ilustrativo que tiene las características descritas anteriormente, pNTu0002, se expone en la Figura 3B.

30 El vector de transformación linealizado se usa después para reemplazar la secuencia de ratón correspondiente en el clon de BAC BMQ-223f24 por recombinación homóloga en células bacterianas. Los clones positivos que contienen una delección de ~1776 pb de los exones 2 a 6 de *April* de ratón se seleccionan con el uso de cloranfenicol e higromicina.

35 El vector de transformación con *APRIL* humano y el clon de BAC de ratón BMQ-223f24 modificado que contiene una delección de los exones 2 a 6 de *April* de ratón se digieren por separado con I-CeuI y AsiSI para producir fragmentos cohesivos compatibles (Figura 3B). El vector de transformación final para humanizar un gen *April* de ratón, producido por ligación de los fragmentos de restricción compatibles, contiene, de 5' a 3', contiene, de 5' a 3', la secuencia genómica de ratón que incluye un gen *Tweak* (*Tnfsf12*) de ratón y la secuencia 5' de un gen *April* de ratón, un exón 1 de *April* de ratón, ~100 pb del intrón 1 de un gen *April* de ratón, ~202 pb del intrón 1 de un gen *APRIL* humano, los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano, ~126 pb de la secuencia humana 3' del exón 6 de un gen *APRIL* humano, un casete de neomicina autoeliminable flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasa *LoxP*, secuencia genómica de ratón que incluye la 3' UTR de un gen *April* de ratón que incluye ~83 pb 3' del codón de terminación que aparece en un gen *April* de ratón, la secuencia genómica de ratón que incluye ~350 pb corriente abajo de un gen *April* de ratón y corriente arriba de un gen *Senp3* de ratón, y un gen *Senp3* de ratón.

El vector de transformación final con *APRIL* humanizado se usa para electroporar células madre embrionarias (ES) de ratón BALB-*Rag2^{-/-}IL2Ryc^{-/-}* (DKO) para crear células ES modificadas que comprenden un gen *April* que se encuentra humanizado desde aproximadamente la mitad del intrón 1 de un gen *April* de ratón (~100 pb 3' del sitio donante de corte y empalme) hasta aproximadamente 100 pb 3' del sitio de poliadenilación de un gen *APRIL* humano que se inserta en aproximadamente la mitad de la 3' UTR de un gen *April* de ratón (Figura 3B). Las células ES transformadas positivamente que contienen un gen *April* humanizado se identifican mediante un ensayo (Valenzuela y otros, *más arriba*) que detecta la presencia de la secuencia del gen *APRIL* humano y confirma la pérdida de las secuencias del gen *April* de ratón. La Tabla 4 expone los cebadores y sondas que se usan para confirmar la humanización de un gen *April* endógeno como se describió anteriormente. hAPRIL: APRIL humano; mApril: April de ratón.

Los clones positivos de células ES pueden usarse 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 2 a 6 de un gen *APRIL* humano en un gen *April* endógeno de un ratón. Los ratones que portan la humanización de los exones 2 a 6 de un gen *April* endógeno se identifican mediante genotipificación del ADN aislado a partir de fragmentos de la cola con el uso de un ensayo de modificación de alelos (Valenzuela y otros, *más arriba*) que detecta la presencia de las secuencias del gen *APRIL* humano. Las crías se genotipan y las cohortes de animales heterocigotos para la construcción del gen *April* humanizado se seleccionan para su caracterización.

Tabla 4

Nombre	Localización	Cebador	Secuencia (5'-3')	
mApril-1	mApril exón 4	Directo	GAGGCCCCAGGGAGACATTG	La sec. con núm. de ident.: 13
		Inverso	GCAGGCTCAGGGCTTATCTG	La sec. con núm. de ident.: 14
		Sonda	CGAGTCTGGGACACTGGAATTTATCTGC	La sec. con núm. de ident.: 15
		Directo	AACTTGCTCCATCCCTTACATC	sec. con núm. de ident.: 16
mApril-2	mApril intrón 5	Inverso	GCTTGAGAGTTGGTTCCTTCTTT	sec. con núm. de ident.: 17
		Sonda	TCACCTCCTGGGTTTGATTCCGA	sec. con núm. de ident.: 18
		Directo	CCTGCACCTGGTCCCATT	sec. con núm. de ident.: 19
hAPRIL-1a	hAPRIL exón 3	Inverso	AGCCCGAGTTCCTGGTTATTGC	sec. con núm. de ident.: 20
		Sonda	AACGCCACCTCCAAGGGTGA	sec. con núm. de ident.: 21
		Directo	AGGAGCCTCGGGTGTATCGTA	sec. con núm. de ident.: 22
hAPRIL-2a	hAPRIL exón 6, 3'UTR	Inverso	GCAGGGCTTGATCAGAAAGAAGAG	sec. con núm. de ident.: 23
		Sonda	CCCTGGTGTGGTGTTCCTCA	sec. con núm. de ident.: 24

Ejemplo 2. Expresión de ligando inductor de la proliferación (A Proliferación-Inducing Ligand, APRIL) humanizado en animales no humanos

Este ejemplo ilustra la expresión característica de un gen *April* humanizado en las células de un animal no humano como se describió en el Ejemplo 1. El gen *April* humanizado codifica un polipéptido April que comprende la porción extracelular de una proteína APRIL humana unida a la porción intracelular de una proteína APRIL no humana. En este ejemplo, los transcritos de ARNm que comprenden el exón 1 de un gen *April* de ratón y los exones 2 a 6 de un gen *APRIL* humano se confirmaron por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) con el uso de cebadores ubicados en las secuencias de los exones humanos y de ratón del gen *April* humanizado.

Brevemente, las suspensiones de células de médula ósea y bazo aislados de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones heterocigotos para un gen *April* humanizado se prepararon con el uso de métodos estándar. La médula ósea se recolectó de los fémures mediante lavado con medio RPMI completo complementado con suero fetal de ternero, piruvato de sodio, HEPES, 2-mercaptoetanol, aminoácidos no esenciales, y gentamicina. Los bazo se perfundieron con Colagenasa D (Roche Bioscience) y los eritrocitos de las preparaciones de bazo y médula ósea se lisaron con un tampón de lisis a base de cloruro de amonio (*por ejemplo*, tampón de lisis ACK), seguido de lavado con medio RPMI completo. El ARN se extrajo de las preparaciones de bazo y médula ósea con el uso de TRIzol™ (Invitrogen) o Qiagen RNeasy™ Mini Kit (Qiagen) y se cebaron con cebadores específicos para el exón 1 de *April* de ratón (mF1; AGTCAGAGAG CCAGCCCTT; sec. con núm. de ident.: 25) y el exón 5 de *APRIL* humano (hR3; ACATCGGAAT AGAGTCTCCT GC; sec. con núm. de ident.: 26) con el uso del sistema de RT-PCR Superscript™ III One-Step (Invitrogen). Se analizaron alícuotas (5 - 10 µl) de cada reacción por electroforesis en agarosa (Figura 4). El producto de amplificación predicho con el uso de los cebadores mF1 y hR3 era de 526 pb. Los productos de reacción se purificaron a partir del gel y se confirmaron por secuenciación.

Como se muestra en la Figura 4, la expresión de los transcritos que codifican un polipéptido April que comprende la

porción extracelular de una proteína APRIL humana unida a la porción intracelular de una proteína April no humana se detectó claramente en el bazo y la médula ósea de ratones heterocigotos.

Equivalentes

5 Habiendo descrito así diversos aspectos de al menos una modalidad de esta invención, los expertos en la técnica apreciarán que pueden idear fácilmente diversas alteraciones, modificaciones, y mejoras. Tales alteraciones, modificaciones, y mejoras están destinadas a ser parte de esta descripción y están destinadas a estar dentro del alcance de la invención. En consecuencia, la descripción y figuras anteriores son solo a manera de ejemplo y la
10 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
15 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 descripción. 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 descripción.
20
25
30
35
40

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 descripción.

Listado de secuencias

45 <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc. McWhirter, John Gurer, Cagan Macdonald, Lynn Murphy, Andrew J.

<120> ANIMALES NO HUMANOS QUE TIENEN UN GEN DE UN LIGANDO INDUCTOR DE LA PROLIFERACIÓN HUMANIZADO

50 <130> 31016 (6825)

<150> 61/905,986

<151> 2013-11-19

55 <160> 26

<170> PatentIn versión 3.5

60 <210> 1

<211> 1676

<212> ADN

<213> Mus musculus

65 <400> 1

ES 2 703 549 T3

gaaggctggc cgctccttct ggggtgtcacg gctgccctgt ccttcctaga taatggcacc 60
 aaattctcct gaggctaggg ggaaggagt gtcagagtgt cactagctcg accctgggga 120
 5 caagggggac taatagtacc ctgacttgat ttcttctat tctcaagttc ctttttattt 180
 ctcccttgcg taaccgctc ttcccttctg tgcctttgcc tgtattcca ccctccctgc 240
 tacctcttgg ccacctcact tctgagacca cagctgttg cagggtcctt agctcatgcc 300
 10 agcctcatct ccaggccaca tggggggctc agtcagagag ccagccctt cggttgctct 360
 ttggttgagt tggggggcag ttctgggggc tgtgacttgt gctgtcgcac tactgatcca 420
 acagacagag ctgcaaagcc taaggcggga ggtgagccgg ctgcagcggg gtggagggcc 480
 15 ttcccagaag cagggagagc gcccatggca gagcctctgg gagcagagtc ctgatgtcct 540
 ggaagcctgg aaggatgggg cgaatctctg gagaaggaga gcagtactca ccagaagca 600
 20 caagaagaag cactcagtcc tgcacttctg tccagttaac attacctcca aggactctga 660
 cgtgacagag gtgatgtggc aaccagtact taggcgtggg agaggcctgg aggccaggg 720
 agacattgta cgagtctggg aactggaat ttatctgctc tatagtcagg tcctgtttca 780
 25 tgatgtgact ttcacaatgg gtcaggtggg atctcgggaa ggacaaggga gaagagaaac 840
 tctattccga tgtatcagaa gtatgcctc tgatcctgac cgtgcctaca atagctgcta 900
 cagtgcaggt gtctttcatt tacatcaagg ggatattatc actgtcaaaa ttccacgggc 960
 30 aaacgcaaaa cttagccttt ctccgatgg aacattcctg gggtttgtga aactatgatt 1020
 gttataaagg ggggtgggat ttcccattcc aaaaactggc tagacaaagg acaaggaacg 1080
 35 gtcaagaaca gctctccatg gctttgcctt gactgttgtt cctcccttg cctttccgc 1140
 tcccactatc tgggctttga ctccatggat attaaaaag tagaatattt tgtgtttatc 1200
 tcccacacag ccccaaattc ttttgtgtg tgtgcgaagg gggttttgcg cactgtgcca 1260
 40 agccttgctc actggaatgc atccagaaca gcagcaccat ctagcggcag gttgaggaaa 1320
 gactatggtc tctgctaggg aaaaccttat ccaactctc aagtaccctc tgcttcaatt 1380
 aacaagaagc ccggctttca gtatttcacc tattgctcc aaattcttgt tactatctag 1440
 45 aaaaagatat atgttaggtg cctcgatatg catgccattc atcctccca ttctctata 1500
 cacttccgag ctgggcactg agctttacgc cttaaatcac agtactcggg aggcagatct 1560
 50 cgatgagttc gagggcaact tggctctaaat agtgagttcc aggccacca ggggttacia 1620
 tggtgagacc ctgtctcaa caaactaaca acaataaaa cgaaaggctc tccacg 1676

<210> 2
 55 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2
 60

65

ES 2 703 549 T3

1 Met Pro Ala Ser Ser Pro Gly His Met Gly Gly Ser Val Arg Glu Pro
 5 Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp Leu Ser Trp Gly Ala Val Leu Gly Ala
 10 Val Thr Cys Ala Val Ala Leu Leu Ile Gln Gln Thr Glu Leu Gln Ser
 15 Leu Arg Arg Glu Val Ser Arg Leu Gln Arg Ser Gly Gly Pro Ser Gln
 20 Lys Gln Gly Glu Arg Pro Trp Gln Ser Leu Trp Glu Gln Ser Pro Asp
 25 Val Leu Glu Ala Trp Lys Asp Gly Ala Lys Ser Arg Arg Arg Ala
 30 Val Leu Thr Gln Lys His Lys Lys Lys His Ser Val Leu His Leu Val
 35 Pro Val Asn Ile Thr Ser Lys Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp
 40 Gln Pro Val Leu Arg Arg Gly Arg Gly Leu Glu Ala Gln Gly Asp Ile
 45 Val Arg Val Trp Asp Thr Gly Ile Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu
 50 Phe His Asp Val Thr Phe Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly
 55 Gln Gly Arg Arg Glu Thr Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser
 60 Asp Pro Asp Arg Ala Tyr Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His
 65 Leu His Gln Gly Asp Ile Ile Thr Val Lys Ile Pro Arg Ala Asn Ala
 70 Lys Leu Ser Leu Ser Pro His Gly Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu
 75 225 230 235 240

<210> 3
 <211> 408
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 3

ES 2 703 549 T3

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

ES 2 703 549 T3

Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu Thr Lys Ile Asn Ser Ser Ser Pro Leu
 130 135 140

5

Arg Tyr Asp Arg Gln Ile Gly Glu Phe Thr Val Ile Arg Ala Gly Leu
 145 150 155 160

10

Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val His Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val Tyr
 165 170 175

15

Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asn Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu
 180 185 190

20

Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser Pro Gly Pro Gln Leu Arg
 195 200 205

25

Leu Cys Gln Thr Glu Leu Gln Ser Leu Arg Arg Glu Val Ser Arg Leu
 210 215 220

30

Gln Arg Ser Gly Gly Pro Ser Gln Lys Gln Gly Glu Arg Pro Trp Gln
 225 230 235 240

35

Ser Leu Trp Glu Gln Ser Pro Asp Val Leu Glu Ala Trp Lys Asp Gly
 245 250 255

40

Ala Lys Ser Arg Arg Arg Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys His Lys Lys
 260 265 270

45

Lys His Ser Val Leu His Leu Val Pro Val Asn Ile Thr Ser Lys Asp
 275 280 285

50

Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Val Leu Arg Arg Gly Arg
 290 295 300

55

Gly Leu Glu Ala Gln Gly Asp Ile Val Arg Val Trp Asp Thr Gly Ile
 305 310 315 320

60

Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe His Asp Val Thr Phe Thr Met
 325 330 335

65

Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Arg Glu Thr Leu Phe
 340 345 350

70

Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser Asp Pro Asp Arg Ala Tyr Asn Ser
 355 360 365

75

Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile Ile Thr
 370 375 380

80

Val Lys Ile Pro Arg Ala Asn Ala Lys Leu Ser Leu Ser Pro His Gly
 385 390 395 400

85

Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu
 405

ES 2 703 549 T3

<210> 4
 <211> 2293
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5
 <400> 4

10	ccggaaccct gtgtgctggg gaggaatccc gcagtggccg gggggcttga ggccgctgct	60
	ttgtctcttc gtccagagcc ttatgtaaga gcttttctcg ggaaacagga agtcctgctt	120
	gccaatctca gcacagggag tagtgacaggc cttattccaa cacacccggc ccagccttaa	180
15	ccccagaact cagccagttt cttgcttccg tgcccctggt tctcctcccc atcgagccca	240
	cccctccttt ccacacctca gtcaccccta gtgaactgcc ccagcgatct ctgctgtgct	300
	tgaccccgag ggtcttccac cctcgccctg accctggaca ctgcccagct tggccccca	360
20	tcctgctcct ggcacaatgc cctctagcca gccaaccttc cctcccccaa ccctggggcc	420
	gccccagggt tcctgcgcac tgccctgttc tcctgggtgt cactggcagc cctgtccttc	480
	ctagagggac tggaacctaa ttctcctgag gctgagggag ggtggagggt ctcaaggcaa	540
25	cgctggcccc acgacggagt gccaggagca ctaacagtac ccttagcttg ctttctcct	600
	ccctcctttt tattttcaag ttcttttta tttctccttg cgtaacaacc ttcttccctt	660
	ctgcaccact gcccgtagcc ttaccggccc cggcacctcc ttgctacccc actcttgaaa	720
30	ccacagctgt tggcagggtc cccagctcat gccagcctca tctcctttct tgtagcccc	780
	caaagggcct ccaggcaaca tggggggccc agtcagagag ccggcactct cagttgccct	840
35	ctggttgagt tggggggcag ctctgggggc cgtggcttgt gccatggctc tgctgacca	900
	acaaacagag ctgcagagcc tcaggagaga ggtgagccgg ctgcagggga caggaggccc	960
	ctcccagaat ggggaagggt atccctggca gagtctcccg gagcagagtt ccgatgccct	1020
40	ggaagcctgg gagaatgggg agagatcccg gaaaaggaga gcagtgtca cccaaaaaca	1080
	gaagaagcag cactctgtcc tgcacctggt tcccattaac gccacctcca aggatgactc	1140
	cgatgtgaca gaggtgatgt ggcaaccagc tcttaggcgt gggagaggcc tacaggccca	1200
45	aggatatggt gtccgaatcc aggatgctgg agtttatctg ctgtatagcc aggtcctggt	1260
	tcaagacgtg actttcacca tgggtcaggt ggtgtctcga gaaggccaag gaaggcagga	1320
50	gactctattc cgatgtataa gaagtatgcc ctcccacccg gaccggcct acaacagctg	1380
	ctatagcgca ggtgtcttcc atttacacca aggggatatt ctgagtgtca taattccccg	1440

55

60

65

ES 2 703 549 T3

ggcaagggcg aaacttaacc tctctccaca tggaaccttc ctggggtttg tgaaactgtg 1500
 attgtgttat aaaaagtggc tcccagcttg gaagaccagg gtgggtacat actggagaca 1560
 5 gccaaagagct gagtatataa aggagagggga atgtgcagga acagaggcgt cttcctgggt 1620
 ttggctcccc gttcctcact tttccctttt cattcccacc ccctagactt tgattttacg 1680
 gatatcttgc ttctgttccc catggagctc cgaattcttg cgtgtgtgta gatgaggggc 1740
 10 gggggacggg cgccaggcat tgtccagacc tggtcggggc ccaactggaag catccagaac 1800
 agcaccacca tctagcggcc gctcgagggg agcacccgcc ggttggccga agtccacgaa 1860
 gccgacctct gctagggaaa acccctggtt ctccatgcca cacctctctc caggtgccct 1920
 15 ctgcctcttc accccacaag aagccttacc ctacgtcctt ctctccatct atcggacccc 1980
 agtttccatc actatctcca gagatgtagc tattatgcmc ccgtctacag ggggtgcccg 2040
 20 acgatgacgg tgccttcgca gtcaaattac tcttcgggtc ccaaggtttg gctttcacgc 2100
 gctccattgc cccggcgtgg caggccattc caagcccttc cgggctggaa ctgggtgctgg 2160
 aggagcctcg ggtgtatcgt acgccctggt gttggtggtg cctcactcct ctgagctctt 2220
 25 ctttctgatc aagccctgct taaagttaaa taaaatagaa tgaatgatac cccggcaaaa 2280
 aaaaaaaaaaaa aaa 2293

30 <210> 5
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 5

Met Pro Ala Ser Ser Pro Phe Leu Leu Ala Pro Lys Gly Pro Pro Gly
 1 5 10 15
 40 Asn Met Gly Gly Pro Val Arg Glu Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp
 20 25 30
 45 Leu Ser Trp Gly Ala Ala Leu Gly Ala Val Ala Cys Ala Met Ala Leu
 35 40 45
 50 Leu Thr Gln Gln Thr Glu Leu Gln Ser Leu Arg Arg Glu Val Ser Arg
 50 55 60
 55 Leu Gln Gly Thr Gly Gly Pro Ser Gln Asn Gly Glu Gly Tyr Pro Trp
 65 70 75 80
 60 Gln Ser Leu Pro Glu Gln Ser Ser Asp Ala Leu Glu Ala Trp Glu Asn
 85 90 95
 65 Gly Glu Arg Ser Arg Lys Arg Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Gln Lys

ES 2 703 549 T3

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

<210> 9
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

55 Met Pro Ala Ser Ser Pro Phe Leu Leu Ala Pro Lys Gly Pro Pro Gly
 1 5 10 15
 60 Asn Met Gly Gly Pro Val Arg Glu Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp

65

ES 2 703 549 T3

5	Leu	Ser	Trp	Gly	Ala	Ala	Leu	Gly	Ala	Val	Ala	Cys	Ala	Met	Ala	Leu			
			35					40					45						
	Leu	Thr	Gln	Gln	Thr	Glu	Leu	Gln	Ser	Leu	Arg	Arg	Glu	Val	Ser	Arg			
		50					55					60							
10	Leu	Gln	Gly	Thr	Gly	Gly	Pro	Ser	Gln	Asn	Gly	Glu	Gly	Tyr	Pro	Trp			
	65				70						75					80			
	Gln	Ser	Leu	Pro	Glu	Gln	His	Ser	Val	Leu	His	Leu	Val	Pro	Ile	Asn			
15					85					90					95				
	Ala	Thr	Ser	Lys	Asp	Asp	Ser	Asp	Val	Thr	Glu	Val	Met	Trp	Gln	Pro			
20				100					105					110					
	Ala	Leu	Arg	Arg	Gly	Arg	Gly	Leu	Gln	Ala	Gln	Gly	Tyr	Gly	Val	Arg			
			115					120					125						
25	Ile	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe	Gln			
		130					135					140							
	Asp	Val	Thr	Phe	Thr	Met	Gly	Gln	Val	Val	Ser	Arg	Glu	Gly	Gln	Gly			
30		145				150					155					160			
	Arg	Gln	Glu	Thr	Leu	Phe	Arg	Cys	Ile	Arg	Ser	Met	Pro	Ser	His	Pro			
35					165					170					175				
	Asp	Arg	Ala	Tyr	Asn	Ser	Cys	Tyr	Ser	Ala	Gly	Val	Phe	His	Leu	His			
				180					185					190					
40	Gln	Gly	Asp	Ile	Leu	Ser	Val	Ile	Ile	Pro	Arg	Ala	Arg	Ala	Lys	Leu			
			195					200					205						
	Asn	Leu	Ser	Pro	His	Gly	Thr	Phe	Leu	Gly	Phe	Val	Lys	Leu					
45		210					215					220							
50	<210>	10																	
	<211>	205																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Homo sapiens																	
55	<400>	10																	
	Met	Gly	Gly	Pro	Val	Arg	Glu	Pro	Ala	Leu	Ser	Val	Ala	Leu	Trp	Leu			
	1				5					10					15				
60	Ser	Trp	Gly	Ala	Ala	Leu	Gly	Ala	Val	Ala	Cys	Ala	Met	Ala	Leu	Leu			
65																			

ES 2 703 549 T3

<210> 12
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína APRIL humanizada

<400> 12

10

Met Pro Ala Ser Ser Pro Gly His Met Gly Gly Ser Val Arg Glu Pro
 1 5 10 15

15

Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp Leu Ser Trp Gly Ala Val Leu Gly Ala
 20 25 30

20

Val Thr Cys Ala Val Ala Leu Leu Ile Gln Gln Thr Glu Leu Gln Ser
 35 40 45

25

Leu Arg Arg Glu Val Ser Arg Leu Gln Arg Ser Gly Gly Pro Ser Gln
 50 55 60

30

Lys Gln Gly Glu Arg Pro Trp Gln Ser Leu Trp Glu Gln Ser Ser Asp
 65 70 75 80

Ala Leu Glu Ala Trp Glu Asn Gly Glu Arg Ser Arg Lys Arg Arg Ala
 85 90 95

35

Val Leu Thr Gln Lys Gln Lys Lys Gln His Ser Val Leu His Leu Val
 100 105 110

Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met
 115 120 125

40

Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr
 130 135 140

45

Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val
 145 150 155 160

Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu

50

55

60

65

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético: mApril-2, intrón 5 de mApril, Directo		
	<400> 16		
5		aacttgctcc atcccttaca tc	22
	<210> 17		
10	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
15	<223> Oligonucleótido sintético: mApril-2, intrón 5 de mApril, Inverso		
	<400> 17		
20		gcttgagagt tggttccttc cttt	24
	<210> 18		
	<211> 23		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético: mApril-2, intrón 5 de mApril, Sonda		
30	<400> 18		
		tcacctcctg ggtttgattc cga	23
35	<210> 19		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético: hAPRIL-1a, exón 3 de hAPRIL, Directo		
	<400> 19		
45		cctgcacctg gttcccatt	19
	<210> 20		
	<211> 22		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético: hAPRIL-1a, exón 3 de hAPRIL, Inverso		
55	<400> 20		
		agccccgagtt cctggttatt gc	22
60	<210> 21		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
65			

ES 2 703 549 T3

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético: hAPRIL-1a, exón 3 de hAPRIL, Sonda		
	<400> 21		
5		aacgccacct ccaaggggtga	20
	<210> 22		
10	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
15	<223> Oligonucleótido sintético: hAPRIL-2a, exón 6 de hAPRIL, 3'UTR, Directo		
	<400> 22		
20		aggagcctcg ggtgtatcgt a	21
	<210> 23		
	<211> 24		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético: hAPRIL-2a, exón 6 de hAPRIL, 3'UTR, Inverso		
30	<400> 23		
		gcagggcttg atcagaaaga agag	24
35	<210> 24		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético: hAPRIL-2a, exón 6 de hAPRIL, 3'UTR, Sonda		
	<400> 24		
45		ccctggtggtt ggtgttgctt ca	22
	<210> 25		
	<211> 19		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
55	<223> cebadores específicos para el exón 1 de April de ratón Oligonucleótido sintético:		
	<400> 25		
60		agtcagagag ccagccctt	19
	<210> 26		
	<211> 22		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

ES 2 703 549 T3

<220>

<223> Oligonucleótido sintético: cebadores específicos para el exón 5 de APRIL humano

<400> 26

5

acatcggaaat agagtctcct gc

22

REIVINDICACIONES

1. Un roedor modificado genéticamente cuyo genoma comprende un reemplazo de un fragmento genómico que comprende los exones 2-5 y la porción codificante del exón 6 de un gen de ligando inductor de la proliferación (*A Proliferation-Inducing Ligand, April*) endógeno de roedor con un fragmento genómico humano que comprende los exones 2-6 de un gen *APRIL* humano para formar un gen *April* humanizado, en donde el reemplazo es en un locus *April* endógeno de roedor, en donde el gen *April* humanizado se encuentra bajo el control de un promotor de *April* de roedor en dicho locus *April* endógeno de roedor, y codifica una proteína *April* humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína *APRIL* humana codificada por dicho gen *APRIL* humano unida a una porción intracelular de la proteína *April* de roedor codificada por dicho gen de *April* de roedor, y en donde dicho roedor modificado genéticamente expresa dicha proteína *April* humanizada.
2. El roedor modificado genéticamente de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho roedor no expresa de manera detectable una proteína *April* 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 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 la proteína *April* humanizada comprende los aminoácidos 87 a 250 de la sec. con núm. de ident.: 5.
6. El roedor modificado genéticamente de conformidad con la reivindicación 4, en donde el gen *April* humanizado comprende el exón 1 de dicho gen *April* endógeno de ratón.
7. El roedor modificado genéticamente de conformidad con la reivindicación 6, en donde dicha proteína *April* humanizada comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la sec. con núm. de ident.: 12.
8. El roedor modificado genéticamente de conformidad con la reivindicación 1, en donde los exones codificantes del gen *April* humanizado consisten en el exón 1 de dicho gen *April* endógeno de roedor, y los exones 2-6 de dicho gen *April* humano.
9. Una célula o tejido aislado de un roedor modificado genéticamente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
10. Una célula madre embrionaria (ES) de roedor, cuyo genoma comprende un reemplazo de un fragmento genómico que comprende los exones 2-5 y la porción codificante del exón 6 de un gen *April* endógeno de roedor con un fragmento genómico humano que comprende los exones 2-6 de un gen *APRIL* humano para formar un gen *April* humanizado, en donde el reemplazo es en un locus *April* endógeno de roedor, en donde el gen *April* humanizado se encuentra bajo el control de un promotor de *April* de roedor en dicho locus *April* endógeno de roedor, y codifica una proteína *April* humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína *APRIL* humana codificada por dicho gen *APRIL* humano unida a una porción intracelular de la proteína *April* de roedor codificada por dicho gen *April* de roedor.
11. Un embrión de roedor generado a partir de la célula ES de conformidad con la reivindicación 10.
12. La célula (ES) de roedor de conformidad con la reivindicación 10, o el embrión de roedor de conformidad con la reivindicación 11, en donde el roedor es un ratón o una rata.
13. Un método para producir un roedor que expresa una proteína *April* humanizada a partir de un locus *April* endógeno, el método comprende las etapas de:
 - (a) reemplazar un fragmento genómico que comprende los exones 2-5 y la porción codificante del exón 6 de un gen *April* endógeno de roedor en un locus *April* endógeno en una célula madre embrionaria (ES) de roedor con un fragmento genómico que comprende los exones 2-6 de un gen *APRIL* humano para formar un gen *April* humanizado en el locus *April* endógeno de roedor, en donde el gen *April* humanizado se encuentra bajo el control del promotor de *April* de roedor en dicho locus *April* endógeno de roedor y codifica una proteína *April* humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína *APRIL* humana codificada por dicho gen *APRIL* humano unida a una porción intracelular de la proteína *April* de roedor codificada por dicho gen *April* de roedor;
 - (b) obtener una célula ES de roedor modificada que comprende dicho gen *April* humanizado en el locus *April* 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 12, 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 April endógena de roedor de longitud completa.

16. Un método para injertar células humanas en un ratón, el método comprende las etapas de:

- 5
- (a) proporcionar un ratón cuyo genoma comprende un reemplazo de un fragmento de roedor que comprende los exones 2-5 y la porción codificante del exón 6 de un gen *April* endógeno de ratón con un fragmento genómico humano que comprende los exones 2-6 de un gen *APRIL* humano para formar un gen *April* humanizado, en donde el reemplazo es en un locus *April* endógeno de ratón, en donde el gen *April* humanizado se encuentra
- 10 bajo el control del promotor de *April* de ratón en dicho locus *April* endógeno de ratón y codifica una proteína April humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína APRIL humana codificada por dicho gen *APRIL* humano unida a una porción intracelular de la proteína April de ratón codificada por dicho gen *April* de ratón; y
- 15 (b) trasplantar una o más células humanas en el ratón, opcionalmente; en donde las células humanas son células madre hematopoyéticas humanas.

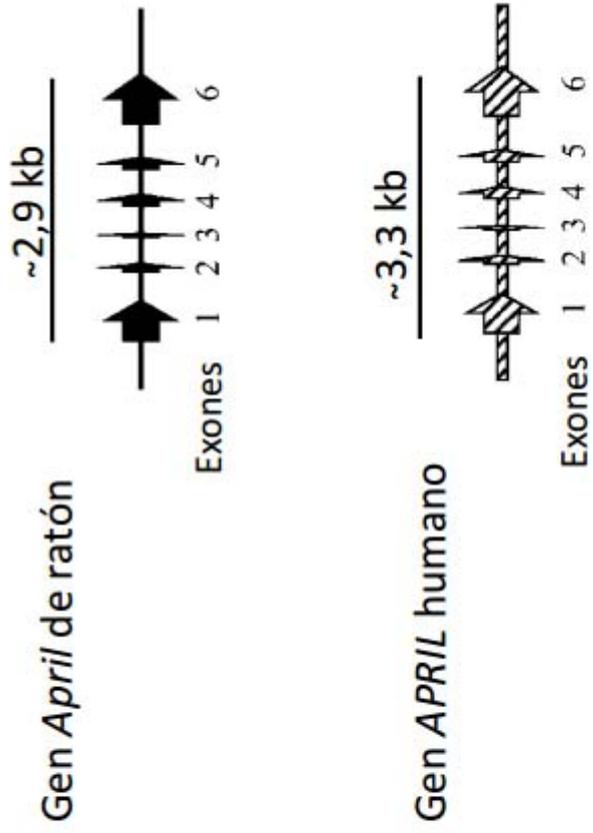


Figura 1

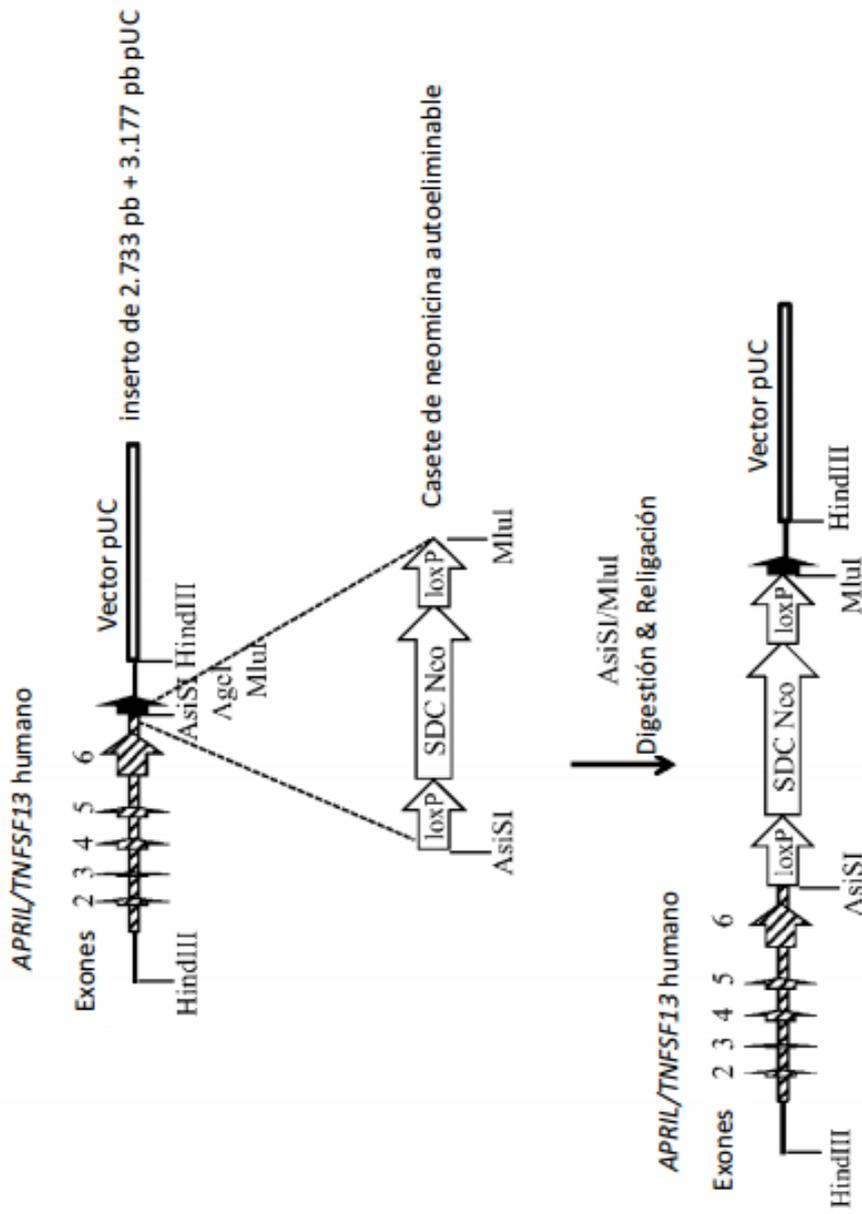


Figura 2A

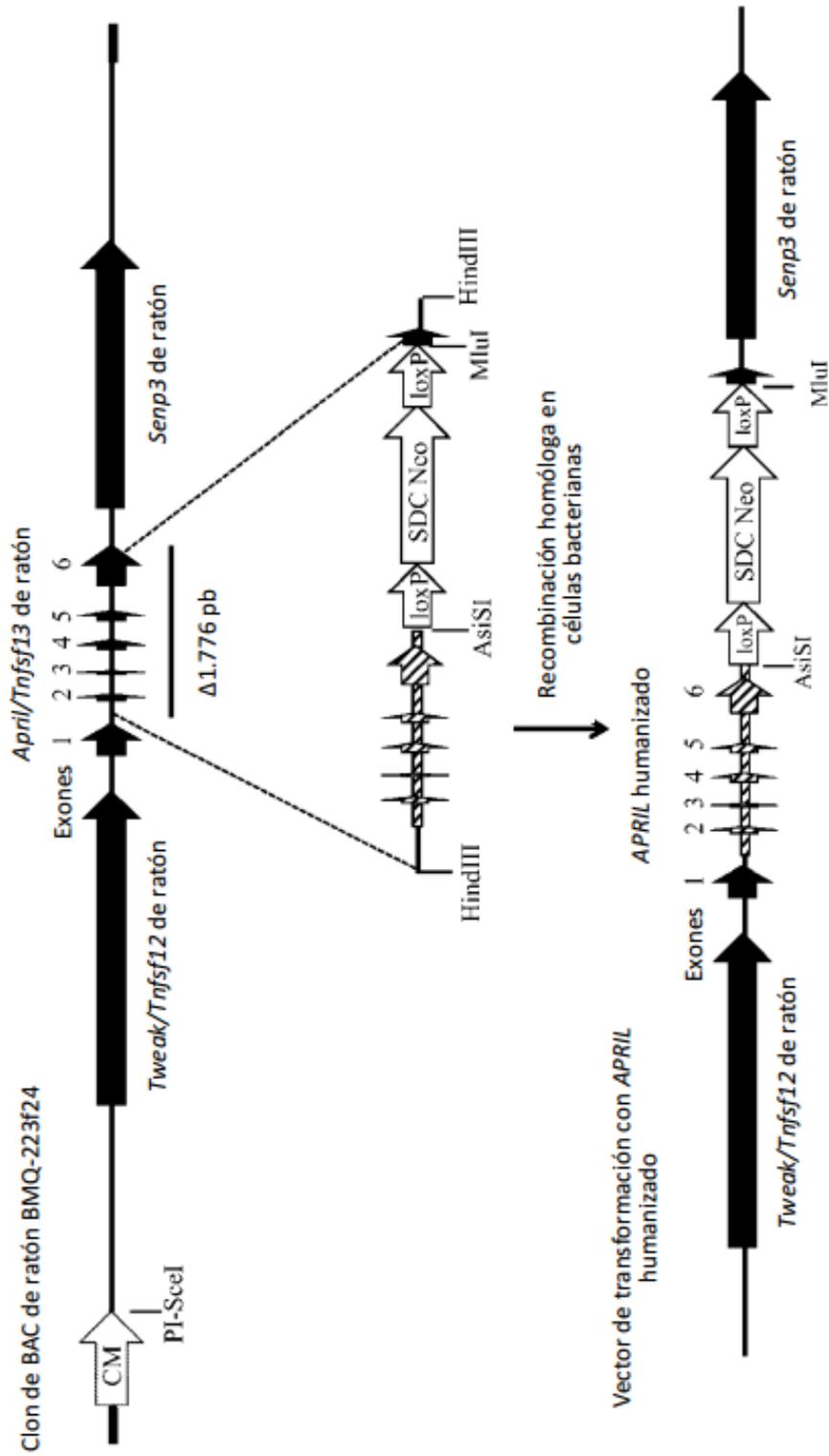


Figura 2B

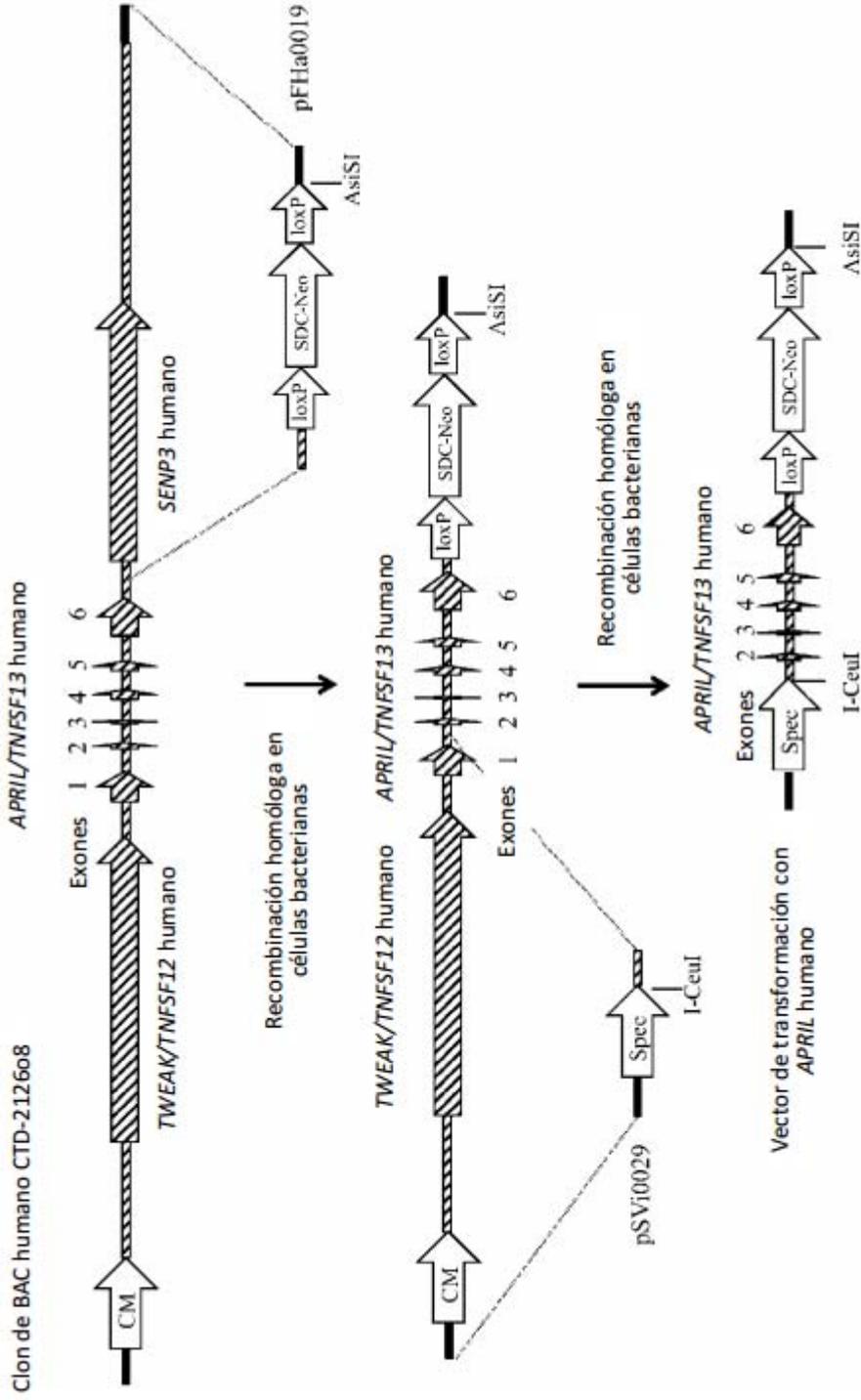


Figura 3A

