

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 282**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2014 E 16206491 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 3175706**

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

30 Prioridad:

23.09.2013 US 201361881261 P

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

24.04.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MURPHY, ANDREW J;
THURSTON, GAVIN;
VARGHESE, BINDU y
GURER, CAGEN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 710 282 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

5 Referencia cruzada con solicitud relacionada

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

10 Antecedentes de la invención

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

Breve descripción de la invención

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

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

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

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

La invención proporciona adicionalmente un método para evaluar la eficacia terapéutica de un fármaco para dirigirse a células humanas, que comprende: (a) proporcionar un roedor de acuerdo con cualquier reivindicación 1-6 en el que se han trasplantado una o más células humanas; (b) administrar un candidato a fármaco a dicho roedor; y (c) controlar las células humanas en el roedor para determinar la eficacia terapéutica del candidato a fármaco.

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

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

65

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- 5 En la presente descripción se describe adicionalmente un método para proporcionar un ratón cuyo genoma incluye un gen de SIRP α que codifica la porción extracelular de una proteína SIRP α humana unida a la porción intracelular de una proteína SIRP α de ratón, el método comprende modificar el genoma de un ratón de manera que éste comprenda un gen de SIRP α que codifique la porción extracelular de una proteína SIRP α humana unida a la porción intracelular de una proteína SIRP α de ratón para proporcionar de esta manera dicho ratón. El gen de SIRP α puede ser un gen de SIRP α como se describe en el presente documento. El gen de SIRP α puede comprender los exones 2, 3, y 4 de un gen de SIRP α humano.
- 10 En la presente descripción se describe además un método para injertar células humanas a un ratón, el método comprende etapas para proporcionar un ratón cuyo genoma comprende un gen de SIRP α que codifica la porción extracelular de una proteína SIRP α humana unida a la porción intracelular de una proteína SIRP α de ratón, y trasplantar una o más células humanas al ratón. El método puede comprender, además, como una etapa, ensayar el injerto de una o más células humanas en el ratón. La etapa de ensayar puede comprender comparar el injerto de una o más células humanas con el injerto en uno o más ratones de tipo silvestre. La etapa de ensayar puede comprender
- 15 comparar el injerto de una o más células humanas con el injerto en uno o más ratones cuyo genoma no comprende un gen de SIRP α que codifica la porción extracelular de una proteína SIRP α humana unida a la porción intracelular de una proteína SIRP α de ratón.
- 20 Las células humanas pueden ser células madre hematopoyéticas. Las células humanas pueden trasplantarse por vía intravenosa. Las células humanas pueden trasplantarse por vía intraperitoneal. Las células humanas pueden trasplantarse por vía subcutánea.
- 25 En la presente descripción se describe además un método que comprende las etapas de proporcionar una o más células cuyo genoma incluye un gen de SIRP α que codifica la porción extracelular de una proteína SIRP α humana unida a la porción intracelular de una proteína SIRP α de ratón, incubar una o más células con un sustrato marcado, y medir la fagocitosis del sustrato marcado por una o más células. Las células pueden ser células de ratón.
- 30 El sustrato puede estar marcado fluorescentemente. El sustrato puede estar marcado con un anticuerpo. El sustrato puede ser uno o más glóbulos rojos. El sustrato puede ser una o más células bacterianas.
- 35 En la presente descripción se describe adicionalmente un método que comprende las etapas de proporcionar un ratón cuyo genoma incluye un gen de SIRP α que codifica la porción extracelular de una proteína SIRP α humana unida a la porción intracelular de una proteína SIRP α de ratón, exponer el ratón a un antígeno, y medir la fagocitosis del antígeno por una o más células del ratón. La etapa de exponer puede comprender exponer el ratón a un antígeno que está marcado fluorescentemente. La etapa de exponer puede comprender exponer el ratón a una o más células que comprenden el antígeno. La etapa de exponer puede comprender exponer el ratón a una o más células humanas que comprenden el antígeno. La etapa de exponer puede comprender exponer el ratón a una o más células bacterianas que comprenden el antígeno.
- 40 Un gen de SIRP α descrito en el presente documento comprende los exones 2, 3, y 4 de un gen de SIRP α humano. Una porción extracelular de una proteína SIRP α humana descrita en el presente documento puede comprender los aminoácidos correspondientes a los residuos 28-362 de una proteína SIRP α humana que aparece en la Tabla 3. Un gen de SIRP α descrito en el presente documento puede unirse operativamente a un promotor de SIRP α de ratón.
- 45 En la presente descripción se describe además un animal no humano que puede obtenerse por los métodos según se describen en el presente documento. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden no expresar de manera detectable una porción extracelular de una proteína SIRP α endógena.
- 50 En la presente descripción se describen además métodos para la identificación o validación de un fármaco o vacuna, el método comprende las etapas de suministrar un fármaco o vacuna a un animal no humano como se describe en el presente documento, y controlar una o más de las respuestas inmunitarias al fármaco o vacuna, el perfil de seguridad del fármaco o vacuna, o el efecto sobre una enfermedad o afección. El control del perfil de seguridad puede incluir la determinación de si el animal no humano exhibe un efecto secundario o reacción adversa como resultado del suministro del fármaco o vacuna. Un efecto secundario o reacción adversa puede seleccionarse de morbilidad,
- 55 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.
- 60 En la presente descripción se describe adicionalmente el uso de un animal no humano de la presente invención en el desarrollo de un fármaco o vacuna para su uso en medicina, tal como su uso como un medicamento.
- 65 En la presente descripción se describe además el uso de un animal no humano descrito en el presente documento para evaluar la eficacia de un fármaco terapéutico que se dirige a células humanas. Un animal no humano descrito en el presente documento puede trasplantarse con células humanas, y puede administrarse al animal un candidato a

fármaco que se dirige a tales células humanas. La eficacia del fármaco se determina mediante el control de las células humanas en el animal no humano después de la administración del fármaco.

5 Los animales no humanos descritos en el presente documento 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.

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

15 Breve descripción de las figuras

La figura incluida en la presente descripción solamente tiene propósitos ilustrativos y no de limitación.

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

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

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

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

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

40 La Figura 6 muestra que Ac 1 suprimió el crecimiento de tumores Raji de manera dependiente de la dosis en ratones BRG SIRP α injertados con hCD34⁺. El volumen de los tumores Raji se midió en los días 3, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30 y 34 después de la implantación del tumor. Se presentan los datos de los animales individuales (Paneles A-D). Los ratones BRG SIRP α injertados con hCD34⁺ recibieron la administración de 2 x 10⁶ células tumorales Raji por vía subcutánea en el Día 0. Los grupos control no recibieron anticuerpo (control de vehículo) (Panel A). Para los grupos experimentales, en el Día 0 los ratones se trataron con una dosis IP de un Ac control de no unión (control Ac 5) a 0,4 mg/kg (Panel B), o Ac 1 a 0,4 mg/kg (Panel C) o 0,04 mg/kg (Panel D), seguido por dosis dos veces a la semana por la duración del estudio. Los datos compuestos para todos los grupos de prueba individuales se muestran en la Figura 7.

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

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

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

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

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

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

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

algunas modalidades, una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre el nivel de un gen o producto génico. En algunas modalidades, una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre la actividad de un gen o producto génico. En algunas modalidades, una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre el nivel o la actividad de un gen o producto génico.

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

15 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.

20 El término "*heterólogo*" como se usa en la presente se refiere a un agente o entidad de una fuente diferente. Por ejemplo, cuando se usa en referencia a un polipéptido, gen, o producto génico o presente en una célula u organismo 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).

25 El término "*célula huésped*", como se usa en la presente, 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 se usan, además, para referirse a la progenie de tal una 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 parental, pero aun así se incluye dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en la presente descripción. En algunas modalidades, una célula huésped es, o comprende, una célula procariota o eucariota. En general, una célula huésped es cualquier célula que sea adecuada para recibir y/o producir un ácido nucleico o una proteína heterólogos, independientemente del reino de la vida al que pertenece la célula. Las células ilustrativas incluyen las de organismos procariotas y eucariotas (unicelulares o pluricelulares), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., etcétera), células de micobacterias, células fúngicas, células de levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolicus*, etcétera), células vegetales, células de insectos (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insectos infectadas con baculovirus, *Trichoplusia ni*, etcétera), células de animales no humanos, células humanas, o fusiones de células tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. En algunas modalidades, la célula es una célula humana, de mono, simio, hámster, rata, o ratón. En algunas modalidades, la célula es eucariota y se selecciona de las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), célula de retina, Vero, CV1, renal (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (por ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral, y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas modalidades, la célula comprende uno o más genes virales, por ejemplo, una célula de retina que expresa un gen viral (por ejemplo, una célula PER.C6™). En algunas modalidades, una célula huésped es, o comprende, una célula aislada. En algunas modalidades, una célula huésped es parte de un tejido. En algunas modalidades, una célula huésped es parte de un organismo.

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

El término "identidad" como se usa en la presente descripción en relación con una comparación de secuencias, se refiere a la identidad determinada mediante una serie de algoritmos diferentes conocidos en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos. En algunas modalidades, las identidades como se describen en la presente se determinan con el uso de un alineamiento ClustalW v. 1.83 (lento) que emplea una penalización por apertura de interrupción de 10.0, una penalización por extensión de interrupción de 0.1, y el uso de una matriz de similitud de Gonnet (MACVECTOR™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008).

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

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

La frase "ácido nucleico", como se usa en la presente, en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que es una cadena oligonucleotídica o que puede incorporarse a esta. En algunas modalidades, un ácido nucleico es un compuesto y/o sustancia que es una cadena de oligonucleótido, o que puede incorporarse a ella, mediante un enlace fosfodiéster. Como resultará evidente a partir del contexto, en algunas modalidades, "ácido nucleico" se refiere a residuos de ácidos nucleicos individuales (por ejemplo, nucleótidos y/o nucleósidos); en algunas modalidades, "ácido nucleico" se refiere a una cadena oligonucleotídica que comprende residuos de ácidos nucleicos individuales. En algunas modalidades, un "ácido nucleico" es o comprende ARN; en algunas modalidades, un "ácido nucleico" es o comprende ADN. En algunas modalidades, un ácido nucleico es, comprende, o consiste en uno o más residuos de ácido nucleico naturales. En algunas modalidades, un ácido nucleico es, comprende, o consiste en uno o más análogos de ácido nucleico. En algunas modalidades, un análogo de ácido nucleico difiere de un ácido nucleico en el hecho de que no utiliza una cadena con enlaces fosfodiéster. Por ejemplo, en algunas modalidades, un ácido nucleico es, comprende, o consiste en uno o más "ácidos nucleicos peptídicos", que se conocen en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en la cadena principal, y se consideran dentro del alcance de la presente invención. Alternativa o adicionalmente, en algunas modalidades, un ácido nucleico tiene uno o más enlaces fosforotioato y/o 5'-N-fosforamida en lugar de enlaces fosfodiéster. En algunas modalidades, un ácido nucleico es, comprende, o consiste en uno o más nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina, y desoxicitidina). En algunas modalidades, un ácido nucleico es, comprende, o consiste en uno o más análogos de nucleósidos (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3 -metil adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinil-citidina, C-5 propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-iodouridina, C5-propinil-uridina, C5 -propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, 0(6)-metilguanina, 2-tiocitidina, bases metiladas, bases intercaladas y combinaciones de estos). En algunas modalidades, un ácido nucleico comprende uno o más azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa, y hexosa) en comparación con los de ácidos nucleicos naturales. En algunas modalidades, un ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que codifican un producto génico funcional tal como un ARN o proteína.

En algunas modalidades, un ácido nucleico incluye uno o más intrones. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos se preparan mediante uno o más de lo siguiente: aislamiento a partir de una fuente natural, síntesis enzimática por polimerización basada en un molde complementario (in vivo o in vitro), reproducción en una célula o sistema recombinantes, y síntesis química. En algunas modalidades, un ácido nucleico es de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 20, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 o más residuos de longitud. En algunas modalidades, un ácido nucleico es monocatenario; en algunas modalidades, un ácido nucleico es bicatenario. En algunas modalidades un ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un elemento que codifica, o es el complemento de una secuencia que codifica, un polipéptido. En algunas modalidades, un ácido nucleico tiene actividad enzimática.

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

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

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

El término "*reemplazo*" se usa en la presente 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. En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico reemplazada y las secuencias de ácidos nucleicos de reemplazo son comparables entre sí porque, por ejemplo, son homólogas entre sí y/o contienen elementos correspondientes (por ejemplo, elementos que codifican proteínas, elementos reguladores, etcétera). En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico reemplazada incluye uno o más de un promotor, un potenciador, un sitio donante de corte y empalme, un sitio receptor

de corte y empalme, un intrón, un exón, una región no traducida (UTR); en algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de reemplazo incluye una o más secuencias codificantes. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de reemplazo es un homólogo de la secuencia de ácido nucleico reemplazada. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de reemplazo es un ortólogo de la secuencia reemplazada. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de reemplazo es, o comprende, una secuencia de ácido nucleico humana. En algunas modalidades, que incluyen cuando la secuencia de ácido nucleico de reemplazo es, o comprende, una secuencia de ácido nucleico humana, la secuencia de ácido nucleico reemplazada es, o comprende, una secuencia de roedor (por ejemplo, una secuencia de ratón). La secuencia de ácido nucleico así colocada puede incluir una o más secuencias reguladoras que son parte de la secuencia de ácido nucleico fuente usada para obtener la secuencia así colocada (por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones 5' o 3' no traducidas, etcétera). Por ejemplo, en diversas modalidades, el reemplazo es una sustitución de una secuencia endógena con una secuencia heteróloga que da como resultado la producción de un producto génico a partir de la secuencia de ácido nucleico así colocada (que comprende la secuencia heteróloga), pero no la expresión de la secuencia endógena; el reemplazo es de una secuencia genómica endógena con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene una función similar a la de la proteína codificada por la secuencia endógena (por ejemplo, la secuencia genómica endógena codifica una proteína SIRP α , y el fragmento de ADN codifica una o más proteínas SIRP α humanas). En diversas modalidades, un gen endógeno o un fragmento de este se reemplaza con un gen humano correspondiente o un fragmento de este. Un gen humano correspondiente o un fragmento de este es un gen humano o un fragmento que es un ortólogo de, o es sustancialmente similar o igual en estructura y/o función, al gen endógeno o fragmento de este que se reemplaza.

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

Una "célula que expresa SIRP" como se usa en la presente descripción se refiere a una célula que expresa un receptor proteico regulador de señales. En algunas modalidades, una célula que expresa SIRP expresa un receptor proteico regulador de señales en su superficie. En algunas modalidades, una proteína SIRP se expresa en la superficie de la célula en una cantidad suficiente para mediar las interacciones célula a célula por medio de la proteína SIRP expresada en la superficie de la célula. Las células que expresan SIRP ilustrativas incluyen neuronas, linfocitos, células mieloides, macrófagos, neutrófilos, y células asesinas naturales (NK). Las células que expresan SIRP regulan la interacción de las células inmunitarias para regular la respuesta inmunitaria a diversos antígenos o patógenos extraños. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden demostrar una regulación de las células inmunitarias por medio de receptores SIRP humanizados expresados en la superficie de una o más células del animal no humano.

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

La frase "*homología sustancial*" como se usa en la presente se refiere a una comparación entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la técnica, generalmente 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.

TABLA 1

Alanina	Ala	A	no polar	neutro	1.8
Arginina	Arg	R	polar	positivo	-4.5
Asparagina	Asn	N	polar	neutro	-3.5
Ácido aspártico	Asp	D	polar	negativo	-3.5

Cisteína	Cys	C	no polar	neutro	2.5
Ácido glutámico	Glu	E	polar	negativo	-3.5
Glutamina	Gln	Q	polar	neutro	-3.5
Glicina	Gly	G	no polar	neutro	-0.4
Histidina	His	H	polar	positivo	-3.2
Isoleucina	Ile	I	no polar	neutro	4.5
Leucina	Leu	L	no polar	neutro	3.8
Lisina	Lys	K	polar	positivo	-3.9
Metionina	Met	M	no polar	neutro	1.9
Fenilalanina	Phe	F	no polar	neutro	2.8
Prolina	Pro	P	no polar	neutro	-1.6
Serina	Ser	S	polar	neutro	-0.8
Treonina	Thr	T	polar	neutro	-0.7
Triptófano	Trp	W	no polar	neutro	-0.9
Tirosina	Tyr	Y	polar	neutro	-1.3
Valina	Val	V	no polar	neutro	4.2

TABLA 2

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

Como se conoce bien en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos pueden compararse con el uso de cualquiera de una variedad de algoritmos, que incluyen los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para las secuencias de nucleótidos y BLASTP, gapped BLAST, y PSI-BLAST para las secuencias de aminoácidos. 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; Baxeavanis, 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. En algunas modalidades, dos secuencias se consideran sustancialmente homólogas si al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus residuos correspondientes son homólogos en un tramo de residuos en cuestión. En algunas modalidades, el segmento relevante es una secuencia completa. En algunas modalidades, el tramo en cuestión es de al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o más residuos. En algunas modalidades, el tramo en cuestión incluye residuos contiguos a lo largo de una secuencia completa. En algunas modalidades, el tramo en cuestión incluye residuos discontinuos a lo largo de una secuencia completa. En algunas modalidades, el tramo en cuestión es de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más residuos.

La frase "*identidad sustancial*" como se usa en la presente se refiere a una comparación entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la técnica, generalmente dos secuencias se consideran "sustancialmente idénticas" si contienen residuos idénticos en las posiciones correspondientes. Como se conoce bien en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos pueden compararse con el uso de cualquiera de una variedad de algoritmos, que incluyen los disponibles en programas informáticos comerciales tales

como BLASTN para las secuencias de nucleótidos y BLASTP, gapped BLAST, y PSI-BLAST para las secuencias de aminoácidos. 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. En algunas modalidades, dos secuencias se consideran sustancialmente idénticas si al menos el 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. En algunas modalidades, el segmento relevante es una secuencia completa. En algunas modalidades, el tramo en cuestión es de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más residuos.

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

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

aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3, o aproximadamente 2 residuos. En algunas modalidades, el polipéptido original o de referencia es uno que se encuentra en la naturaleza. Como entenderán los expertos en la técnica, una pluralidad de variantes de un polipéptido de interés particular puede encontrarse comúnmente en la naturaleza, particularmente cuando el polipéptido de interés es un polipéptido agente infeccioso.

El término "*vector*", como se usa en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se asocia. En algunas modalidades, los vectores son 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 "vectores de expresión."

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

Descripción detallada de la invención

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

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

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

Las proteínas reguladoras de señales (SIRP) constituyen una familia de glicoproteínas de la superficie celular que se expresan en linfocitos, células mieloides (que incluyen macrófagos, neutrófilos, granulocitos, células dendríticas mieloides, y mastocitos) y neuronas (por ejemplo, ver Barclay y Brown, 2006, Nat Rev Immunol 6, 457-464). Se ha informado de numerosos genes de SIRP y éstos pueden categorizarse por sus ligandos respectivos y los tipos de señalización donde están implicados. SIRP α (referido además como CD172A, SHPS1, P84, MYD-1, BIT y PTPNS1) se expresa en células inmunitarias del linaje mieloides y funciona como un receptor inhibitorio por medio de un motivo inhibidor basado en tirosina del inmunorreceptor (ITIM). La expresión de SIRP α se ha observado además en neuronas. Los ligandos informados para SIRP α incluyen, más notablemente, CD47, pero además incluyen las proteínas tensoactivas A y D. SIRP β (referido además como CD172b) se expresa en macrófagos y neutrófilos, sin embargo, no se han informado ligandos conocidos. SIRP β contiene una región citoplasmática corta en comparación con SIRP α y se conoce que se asocia con un componente de señalización conocido como proteína 12 de activación de DNAX (DAP12). Así, SIRP β parece ser un receptor de activación. SIRP γ (referido además como CD172g y SIRP β 2) se expresa en linfocitos y células asesinas naturales y además se une a CD47, sin embargo, no se ha informado una función de señalización ya que la cola citoplasmática solo contiene cuatro aminoácidos y carece de una secuencia que pudiera facilitar la asociación con DAP12. Otro miembro, SIRP δ , se ha descrito y existe como un receptor soluble.

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

Secuencias de SIRP α

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

5 TABLA 3

10	ADNc de ratón de SIRP α NM_007547.3	<p>GCGCTCGGCCGGGCGCCCTCGCGCTGGCCTCGCGACGGCTC CGCACAGCCCCTCGCTCTGCGAGCTGTCCCCGCTCGCGCT TGCTCTCCGATCTCCGTCCCCGCTCCCTCTCCCTCTTCCCTCC CCCTCTTTCCTTCTCCCTCGCTATCCGCTCCCCCGCCCCGTC CTCTGGCTCTGCGCCTGGCTCCCTCGGGTCCGCTCCCCTTTCCC GCCGGCCTGGCCCCGGCGTACGCTCCCGGAGTCTCCCCGCTCG GCGGCGTCTCATTGTGGGAGGGGGTCAGATCACCCGCCGGG CGGTGGCGCTGGGGGGCAGCGGAGGGGGAGGGGCCTTAGTC GTTCGCCCGCGCCGCCCGCCGCTGCCGAGCGCGCTCACCGC CGCTCTCCCTCCTTGCTCTGCAGCCGCGGCCATGGAGCCCGC CGGCCCGGCCCTGGCCGCTAGGGCCGCTGCTGCTCTGCCTG CTGCTCTCCGCGTCTGTTCGTACAGGAGCCACGGGGAAGG <u>AACTGAAGGTGACTCAGCCTGAGAAATCAGTGTCTGTTGCTG</u> <u>CTGGGGATTGACCGTTCTGAACTGCACTTTGACCTCCTTGT</u> <u>GCCGGTGGGACCCATTAGGTGGTACAGAGGAGTAGGGCCAAG</u> <u>CCGGCTGTTGATCTACAGTTTCGCAGGAGAATACGTTCTCGA</u> <u>ATTAGAAATGTTTCAGATACTACTAAGAGAAACAATATGGAC</u> <u>TTTTCCATCCGTATCAGTAATGTCACCCAGCAGATGCTGGCA</u> <u>TCTACTACTGTGTGAAGTCCAGAAAGGATCATCAGAGCCTG</u> <u>ACACAGAAATACAATCTGGAGGGGGAACAGAGGTCTATGTAC</u> <u>TCGCCAAACCTTCTCCACCGGAGGTATCCGGCCCAGCAGACA</u> GGGGCATACCTGACCAGAAAGTGAACCTCACCTGCAAGTCTC ATGGCTTCTCTCCCCGGAATATCACCTGAAGTGGTTCAAAGA TGGGCAAGAACTCCACCCCTTGGAGACCACCGTGAACCCTAG TGGAAAGAATGTCTCCTACAACATCTCCAGCACAGTCAGGGT GGTACTAAACTCCATGGATGTTAATTCTAAGGTCATCTGCGAG GTAGCCACATCACCTTGGATAGAAGCCCTCTTCGTGGGATTG CTAACCTGTCTAACTTCATCCGAGTTTCACCCACCGTGAAGGT <u>CACCCAACAGTCCCCGACGTCAATGAACCAGGTGAACCTCAC</u> <u>CTGCCGGGCTGAGAGGTTCTACCCCGAGGATCTCCAGCTGATC</u> <u>TGGCTGGAGAATGGAAACGTATCACGGAATGACACGCCCAAG</u> <u>AATCTCACAAGAACACGGATGGGACCTATAATTACACAAGC</u> <u>TTGTTCTGGTGAACCTCATCTGCTCATAGAGAGGACGTGGTGT</u> <u>TCACGTGCCAGGTGAAGCACGACCAACAGCCAGCGATCACCC</u> <u>GAAACCATACCGTGCTGGGATTTGCCCACTCGAGTGATCAAG</u> <u>GGAGCATGCAAACCTTCCCTGATAATAATGCTACCCACAAC</u></p>
15		
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		

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

GGAATGTCTTCATCGGTGTGGGCGTGGCGTGTGCTTTGCTCGT
AGTCTGCTGATGGCTGCTCTACCTCCTCCGGATCAAACAG
AAGAAAGCCAAGGGTCAACATCTTCCACACGGTTGCACGAG
CCCGAGAAGAACGCCAGGAAATAACCCAGATCCAGGACAC
AAATGACATCAACGACATCACATACGCAGACCTGAATCTGCC
CAAAGAGAAGAAGCCCGCACCCCGGGCCCCTGAGCCTAACAA
CCACACAGAATATGCAAGCATTGAGACAGGCAAAGTGCCTAG
GCCAGAGGATACCCTCACCTATGCTGACCTGGACATGGTCCA
CCTCAGCCGGGCACAGCCAGCCCCAAGCCTGAGCCATCTTTC
TCAGAGTATGCTAGTGTCCAGGTCCAGAGGAAGTGAATGGGG
CTGTGGTCTGTACTAGGCCCATCCCCACAAGTTTCTTGTCCT
ACATGGAGTGGCCATGACGAGGACATCCAGCCAGCCAATCCT
GTCCCCAGAAGGCCAGGTGGCACGGGTCTTAGGACCAGGGGT
AAGGGTGGCCTTTGCTTCCCTCCGTGGCTTTCAACACCTCTT
GGCACCCACGTCCCCTTCTTCCGGAGGCTGGGTGTGCAGAA
CCAGAGGGCGAACTGGAGAAAGCTGCCGGAATCCAAGAAGT
GTTGTGCCTCGGCCATCACTCGTGGGTCTGGATCCTGGTCTT
GGCAACCCAGGTTGCGTCCTTGATGTTCCAGAGCTTGGTCTT
CTGTGTGGAGAAGAGCTCACCATCTTACCCAACCTGAGCTTT
GGGACCAGACTCCCTTTAGATCAAACCGCCCCATCTGTGGAA
GAACTACACCAGAAGTCAGCAAGTTTTAGCCAACAGTGCTG
GCCTCCCCACCTCCAGGCTGACTAGCCCTGGGGAGAAGGAA
CCCTCTCCTCCTAGACCAGCAGAGACTCCCTGGGCATGTTAG
TGTGGCCCCACCTCCCTTCCAGTCCAGCTTGTTCCTCCAGCT
AGCACTAACTCAGCAGCATCGCTCTGTGGACGCCTGTAAATTA
TTGAGAAATGTGAACGTGCAGTCTTAAAGCTAAGGTGTTAG
AAAATTTGATTTATGCTGTTAGTTGTTGTTGGTCTTCTTTCT
TTTTAATTTCTTTTCTTTTTTGATTTTTTTTCTTTCCCTTAAAA
CAACAGCAGCAGCATCTTGGCTCTTGTGATGTTGAATGGT
TGGGICTTGTGAAGTCTGAGGTCTAACAGTTTTATTGTCTTGA
AGGATTTTCTTACAGCAGAAACAGATTTTTTTCAAATTTCCAG
AATCTGAGGACCAAGAAGGATCCCTCAGCTGCTACTTCCAG
CACCCAGCGTCACTGGGACGAACCAGGCCCTGTTCTTACAAG
GCCACATGGCTGGCCCTTTCCTCCATGGCTACTGTGGTAAGT
GCAGCCTTGTCTGACCCAATGCTGACCTAATGTTGGCCATTC
ACATTGAGGGGACAAGGTCAGTGATGCCCCCTTCACTCACA
AGCACTTCAGAGGCATGCAGAGAGAAGGGACACTCGGCCAGC
TCTCTGAGGTAATCAGTGC AAGGAGGAGTCCGTTTTTTGCCAG
CAAACCTCAGCAGGATCACACTGGAACAGAACCCTGGTCATAC
CTGTGACAACACAGCTGTGAGCCAGGGCAAACCACCCACTGT
CACTGGCTCGAGAGTCTGGGCAGAGGCTCTGACCCCTCACCCCT
TTAAACTGGATGCCGGGGCCTGGCTGGGCCCCAATGCCAAGTG
GTTATGGCAACCCCTGACTATCTGGTCTTAAACATGTAGCTCAGG
AAGTGGAGGCGTAATGTCCCCAATCCCTGGGGATTCTGATT
CCAGCTATTCATGTAAGCAGAGCCAACCTGCCTATTTCTGTAG
GTGCGACTGGGATGTTAGGAGCACAGCAAGGACCCAGCTCTG
TAGGGCTGGTGAACCTGATACTTCTCATAATGGCATCTAGAAGT
TAGGCTGAGTTGGCCTCACTGGCCCAGCAAACCAGAACCTGT
CTTGTCCGGGCCATGTTCTTGGGCTGTCTTCTAATTTCAAAG
GGTTGGTTGGTAAAGCTCCACCCCTTCTCTCTGCCTAAAGA
CATCATATGTGTATACACACACGGGTGTATAGATGAGTTAAA
AGAATGTCCTCGCTGGCATCCTAATTTTGTCTTAAAGTTTTTTTG

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

	<p><u>GAGGGAGAAAGGAACAAGGCAAGGGAAGATGTGTAGCTTTG</u> <u>GCTTTAACCAGGCAGCCTGGGGGCTCCCAAGCCTATGGAACC</u> <u>CTGGTACAAAGAAGAGAACAGAAGCGCCCTGTGAGGAGTGG</u> <u>GATTTGTTTTCTGTAGACCAGATGAGAAGGAAAACAGGCCCT</u> <u>GTTTTGTACATAGTTGCAACTTAAAATTTTTGGCTTGCAAAAT</u> <u>ATTTTTGTAATAAAGATTCTGGGTAACAATAAAAAAAAAAAAA</u> <u>AAAAAA</u> (sec. con núm. de ident.: 1)</p>
<p>Proteína SIRPα de ratón NP_031573.2</p>	<p><u>MEPAGPAPGRLGPLLLCLLLSASCFCCTGATGKELKVTQPEKSVSV</u> <u>AAGDSTVLNCTLTSLLPVGPWRVYRGVGPSRLLIYSFAGEYVPRI</u> <u>RNVSDTTKRNNMDFSRISNVTPADAGIYYCVKFQKGSSEPDTEI</u> <u>QSGGGTEVYVLAKPSPPEVSGPADRGIPDQKVNFTCKSHGFSPRN</u> <u>ITLKWFKDQELHPLETTVNPSGKNVSYNISSTVRVVLNSMDVN</u> <u>SKVICEVAHITLDRSPLRGIANLSNFIRVSPTVKVTQQSPTSMNQV</u> <u>NLT CRAERFYPEDLQLIWLENGNVS RNDTPKNLTKNTDGTNYNT</u> <u>SLFLVNSSAHREDVVFTCQVKHDQQPAITRNHTVLGFAHSSDQG</u> <u>SMQTFPDNNATHNWNVFIGVGVACALLVLLMAALYLLRIKQKKAK</u> <u>GSTSSTRLHEPEKNAREITQIQDNDINDITYADLNLPEKKPAPRAP</u> <u>EPNNHTEYASIE TGKVP RPEDTLTYADLDMVHLSRAQPAPKPEPSFS</u> <u>EYASVQVQRK</u> (sec. con núm. de ident.: 2)</p>
<p>ADN humano de SIRPα NM_001040022.1</p>	<p>TCCGGCCCCGCACCCACCCCAAGAGGGGCCTTCAGCTTTGGG GCTCAGAGGCACGACCTCCTGGGGAGGGTTAAAAGGCAGACG CCCCCGCCCCCGCGCCCCCGCGCCCCGACTCCTTCGCCGC CTCCAGCCTCTCGCCAGTGGGAAGCGGGGAGCAGCCGCGCGG CCGGAGTCCGGAGGCGAGGGGAGGTTCGGCCGCAACTTCCCCG GTCCACCTTAAGAGGACGATGTAGCCAGCTCGCAGCGCTGAC CTTAGAAAAACAAGTTTGCGCAAAGTGGAGCGGGGACCCGGC CTCTGGGCAGCCCCGGCGGCGCTTCCAGTGCCTTCCAGCCCTC GCGGGCGGCGCAGCCGCGGCCCATGGAGCCC GCCGGCCCGG <u>CCCCGGCCGCTCGGGCCGCTGCTCTGCCTGCTGCTCGCCGCG</u> <u>TCCTGCGCCTGGTCAGGAGTGGCGGGTGAGGAGGAGCTGCAG</u> <u>GTGATTCAGCCTGACAAGTCCGTGTTGGTTGCAGCTGGAGAG</u> <u>ACAGCCACTCTGCGCTGCACTGCGACCTCTCTGATCCCTGTGG</u> <u>GGCCCATCCAGTGGTTCAGAGGAGCTGGACCAGGCCGGGAAT</u> <u>TAATCTACAATCAAAAAGAAGGCCACTTCCCCCGGGTAACAA</u> <u>CTGTTTCAGACCTCACAAGAGAAACAACATGGACTTTTCCAT</u> <u>CCGCATCGGTAACATACCCCAGCAGATGCCGGCACCTACTA</u> <u>CTGTGTGAAGTTCCGGAAAGGGAGCCCCGATGACGTGGAGTT</u> <u>TAAGTCTGGAGCAGGCACTGAGCTGTCTGTGCGCGCCAAACC</u> <u>CTCTGCCCCCGTGGTATCGGGCCCTGCGGCGAGGGCCACACCT</u> <u>CAGCACACAGTGAGCTTACCTGCGAGTCCCACGGCTTCTCAC</u> <u>CCAGAGACATACCCCTGAAATGGTTCAAAAATGGGAATGAGC</u> <u>TCTCAGACTTCCAGACCAACGTGGACCCCGTAGGAGAGAGCG</u> <u>TGTCCTACAGCATCCACAGCACAGCCAAGGTGGTGGCTGACCC</u> <u>GCGAGGACGTTCACTCTCAAGTCATCTGCGAGGTGGCCACG</u> <u>TCACCTTGCAAGGGGACCCCTCTTCGTGGGACTGCCAACTTGTC</u> <u>TGAGACCATCCGAGTTCACCCACCTTGGAGGTTACTCAACAG</u> <u>CCCGTGAGGGCAGAGAACCAGGTGAATGTCACCTGCCAGGTG</u> <u>AGGAAGTTCTACCCCAGAGACTACAGCTGACCTGGTTGGAG</u> <u>AATGGAAACGTGTCCCGGACAGAAACGGCCTCAACCGTTACA</u> <u>GAGAACAAAGGATGGTACCTACAACCTGGATGAGCTGGCTCCTG</u></p>

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

GTGAATGTATCTGCCACAGGGATGATGTGAAGCTCACCTGC
 CAGGTGGAGCATGACGGGCAGCCAGCGGTCAGCAAAAGCCAT
 GACCTGAAGGTCTCAGCCACCCGAAGGAGCAGGGCTCAAAT
ACCGCCGCTGAGAACACTGGATCTAATGAACGGAAACATCTAT
ATTGTGGTGGGTGTGGTGTGCACCTTGCTGGTGGCCCTACTGA
TGGCGGCCCTCTACCTCGTCCGAATCAGACAGAAGAAAGCCC
 AGGGCTCCACTTCTTCTACAAGGTTGCATGAGCCCAGAGAAGA
ATGCCAGAGAAATAACACAGGACACAAATGATATCACATATG
 CAGACCTGAACCTGCCAAGGGGAAGAAGCCTGCTCCCCAGG
 CTGCGGAGCCCAACAACCACACGGAGTATGCCAGCATTGAGA
 CCAGCCCAGCCCGCGTCGGAGGACACCCTCACCTATGCTG
 ACCTGGACATGGTCCACCTCAACCGGACCCCAAGCAGCCGG
 CCCCCAAGCCTGAGCCGTCTTCTCAGAGTACGCCAGCGTCCA
 GGTCCCAGGAAGTGAATGGGACCGTGGTTTGTCTAGCACC
 CATCTCTACGCGCTTCTTGTCCCACAGGGAGCCGCCGTGATG
 AGCACAGCCAACCCAGTTCCCAGGAGGGCTGGGGCGGTGCAGG
 CTCTGGGACCCAGGGGCCAGGGTGGCTCTTCTCTCCCCACCCC
 TCTTGGCTCTCCAGCACTTCTTGGGCAGCCACGGCCCCCTCC
 CCCCACATIGCCACATACCTGGAGGCTGACGTTGCCAAACCA
 GCCAGGGAACCAACCTGGGAAGTGGCCAGAACTGCCTGGGGT
 CCAAGAACTCTTGTGCCTCCGTCCATCACCATGTGGGTTTTGA
 AGACCCTCGACTGCCTCCCCGATGCTCCGAAGCCTGATCTTCC
 AGGGTGGGGAGGAGAAAATCCCACCTCCCCTGACCTCCACCA
 CCTCCACCACCACCACCACCACCACCACCACCCTACCACCAC
 CACCCAACTGGGGCTAGAGTGGGGAAAGATTTCCCTTTAGAT
 CAAACTGCCCTTCCATGGAAAAGCTGGAAAAAAACTCTGGA
 ACCCATATCCAGGCTTGGTGAGGTTGCTGCCAACAGTCTGGC
 CTCCCCATCCCTAGGCTAAAGAGCCATGAGTCTTGAGGAG
 GAGAGGACCCCTCCCAAAGGACTGGAGACAAAACCTCTGCT
 TCCTTGGGTCCCTCCAAGACTCCCTGGGGCCCAACTGTGTTGC
 TCCACCCGGACCCATCTCTCCCTTCTAGACCTGAGCTTGCCCC
 TCCAGCTAGCACTAAGCAACATCTCGCTGTGGACGCCTGTAA
 ATTACTGAGAAATGTGAAACGTGCAATCTTGAAACTGAGGTG
 TTAGAAAACCTTGATCTGTGGTGTTTTGTTTTGTTTTTTTCTTA
 AAACAACAGCAACGTGATCTTGGCTGTCTGTCATGTGTTGAAG
 TCCATGGTTGGGTCTTGTGAAGTCTGAGGTTTAAACAGTTTGT
 GTCCTGGAGGGATTTTCTTACAGCGAAGACTTGAGTTCTCCA
 AGTCCCAGAACCCCAAGAATGGGCAAGAAGGATCAGGTCAGC
 CACTCCCTGGAGACACAGCCTTCTGGCTGGGACTGACTTGGCC
 ATGTTCTCAGCTGAGCCACGCGGCTGGTAGTGCAGCCTTCTGT
 GACCCCGCTGTGGTAAGTCCAGCCTGCCAGGGCTGCTGAGG
 GCTGCCTCTTGACAGTGCAGTCTTATCGAGACCCAATGCCTCA
 GTCTGCTCATCCGTAAGTGGGGATAGTGAAGATGACACCCC
 TCCCCACCACCTCTCATAAGCACTTTAGGAACACACAGAGGG
 TAGGGATAGTGGCCCTGGCCGTCTATCCTACCCC'TTLAGTGAC
 CGCCCCATCCCGGCTTTCTGAGCTGATCCTTGAAGAAGAAAT
 CTTCATTTCTGCTCTCAAACCCTACTGGGATCAAACCTGGAAT
 AAATTGAAGACAGCCAGGGGGATGGTGCAGCTGTGAAGCTCG
 GGCTGATTCCCCCTCTGTCCCAGAAGGTTGGCCAGAGGGTGTG
 ACCCAGTTACCCTTTAACCCCCACCCTTCCAGTCGGGTGTGAG
 GGCCTGACCGGGCCCAGGGCAAGCAGATGTCGAAGCCCTAT
 TTATCAGTCTTCACTATAACTCTTAGAGTTGAGACGCCTAATG

5		TTCATGACTCCTGGCCTTGGGATGCCCAAGGGATTTCTGGCTC AGGCTGTAAAAGTAGCTGAGCCATCCTGCCATTCTGGAGG TCCTACAGGTGAAACTGCAGGAGCTCAGCATAGACCCAGCTC TCTGGGGGATGGTCACCTGGTGATTTCAATGATGGCATCCAGG AATTAGCTGAGCCAACAGACCATGTGGACAGCTTTGGCCAGA GCTCCCGTGTGGCATCTGGGAGCCACAGTGACCCAGCCACCT GGCTCAGGCTAGTTCCAAATTCCAAAAGATTGGCTTGTAACC TTCGTCTCCCTCTCTTTTACCCAGAGACAGCACATACGTGTGC ACACGCATGCACACACACATTTCAGTATTTTAAAAGAATGTTTT CTTGGTGCCATTTTCATTTTATTTTATTTTAAATTCTTGGAGG GGGAAATAAGGGAATAAGGCCAAGGAAGATGTATAGCTTTAG CTTTAGCCTGGCAACCTGGAGAATCCACATACCTTGTGTATTG AACCCAGGAAAAGGAAGAGGTCGAACCAACCCTGCGGAAG GAGCATGGTTTCAGGAGTTTATTTTAAAGACTGCTGGGAAGGA AACAGGCCCCATTTTGTATATAGTTGCAACTTAAACTTTTTGG CTTGCAAAATATTTTGTAAATAAAGATTTCTGGGTAATAATGA (sec. con núm. de ident.: 3)
25	proteína SIRPα humana NP_001035111.1	<u>MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKSVL</u> VAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQEGHFPR VTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCCKFRKGSPPDVEF KSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFSRDR ITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTRDVDHS QVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPPTLEVTTQPPVRAENQV NVTQVQRKFPQRLQLTWLENGNVSRTETASTVTENKDGTYNW MSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVSAPHK EQGSNTAAENTGSNERNIYVVGVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKA <u>QGSTSSTRLHEPEKNAREITQDNDITYADLNLPKGGKPPAQAAEPN</u> <u>NHTEYASIQTSPQPA SEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEY</u> <u>ASVQVPRK</u> (sec. con núm. de ident.: 4)
40	proteína SIRPα humanizada	<u>MEPAGPAPGRLGPLLCLLLSASCFCCTGVAGEEELQVIQPKSVL</u> VAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQEGHFPR VTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCCKFRKGSPPDVEF KSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFSRDR ITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTRDVDHS QVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPPTLEVTTQPPVRAENQV NVTQVQRKFPQRLQLTWLENGNVSRTETASTVTENKDGTYNW MSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVSAPHK EQGSNTAADNNATHNWNVFIGVGVACALLVLLMAALYLLRIKQKK <u>AKGSTSSTRLHEPEKNAREITQIQDNDINDITYADLNLPKEKKPAPR</u> <u>APEPNNHTEYASIE TGKVP RPEDTLTYADLDMVHLSRAQPAPKPEPS</u> <u>FSEYASVQVQRK</u> (sec. con núm. de ident.: 5)

Animales no humanos con SIRPα humanizado

- 60 Se describen animales no humanos que expresan proteínas SIRPα humanizadas en la superficie de células inmunitarias (por ejemplo, células mieloides) de los animales no humanos como resultado de una modificación genética de un locus endógeno del animal no humano que codifica una proteína SIRPα. Los ejemplos adecuados descritos en la presente descripción incluyen roedores, particularmente, ratones.
- 65 Un gen de SIRPα humanizado, descrito en el presente documento puede comprender material genético de una especie heteróloga (por ejemplo, seres humanos), en donde el gen de SIRPα humanizado codifica una proteína SIRPα que

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

de la unión y posterior transducción de señales a través de la porción citoplasmática del receptor que no se afecta por la modificación.

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

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

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

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

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

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

En algunas modalidades determinadas, una cepa 129 de la mezcla como se describe en la presente descripción es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En algunas modalidades, un ratón de la presente invención es de una cepa BALB, por ejemplo, la cepa BALB/c. En algunas modalidades, un ratón de la presente invención es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa mencionada anteriormente.

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

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

Se han informado animales no humanos mutantes y transgénicos para SIRP α (por ejemplo, ratones) (Inagaki y otros, 2000, EMBO Journal 19(24):6721-6731; Strowig y otros, 2011, Proc. Nat. Acad. Sci. 108(32):13218-13223). Tales animales se han empleado en una variedad de ensayos para determinar los aspectos moleculares de la expresión, función y regulación de SIRP α . Sin embargo, no lo han sido sin limitación. Por ejemplo, el uso de ratones mutantes para SIRP α se ha limitado debido a las condiciones perjudiciales para la salud que resultan de la incapacidad de las células que contienen la forma mutante de SIRP α frente a la señal. Además, dado que CD47, un ligando de SIRP α , pudiera estar presente en la misma célula que la forma mutante de SIRP α y ambas proteínas son capaces de proporcionar señales intracelulares, no es posible distinguir si tales resultados provienen de la ausencia de señalización de SIRP α o la ausencia de unión a CD47. En el caso de los ratones transgénicos para SIRP α humano, el SIRP α de ratón está intacto y funcional. Así, las funciones dependientes de SIRP α en diversos procesos biológicos (por ejemplo, injertos) no pueden atribuirse claramente a la función de SIRP α humano o SIRP α de ratón solas en estos ratones ya que ambos receptores SIRP α humano y de ratón están presentes y funcionales.

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

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

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

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

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

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

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

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

15 Los animales no humanos descritos en el presente documento proporcionan un sistema *in vivo* mejorado para elucidar los mecanismos de la interacción de célula a célula humana a través de transferencia adoptiva. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden implantarse con un xenoinjerto de tumor, seguido de un segundo implante de linfocitos infiltrantes de tumores que pueden implantarse en los animales no humanos mediante transferencia adoptiva para determinar la eficacia en la erradicación de tumores sólidos u otras enfermedades malignas. Tales experimentos pueden realizarse con células humanas debido a la presencia exclusiva de SIRP α humano sin competencia con SIRP α endógeno del animal no humano. Además, las terapias y los agentes farmacéuticos para usar en el xenotrasplante pueden mejorarse y/o desarrollarse en tales animales no humanos.

25 Los animales no humanos descritos en el presente documento proporcionan un sistema *in vivo* mejorado para el mantenimiento y desarrollo de células madre hematopoyéticas humanas a través del injerto. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden proporcionar un mejor desarrollo y mantenimiento de las células madre humanas dentro del animal no humano. Puede observarse un aumento de 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 descritos en el presente documento pueden proporcionar un aumento en el nivel del injerto de células humanas en comparación con animales no humanos que expresan SIRP α de ratón y humana.

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

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

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

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

65

determinados tumores malignos de células B) y a la subunidad CD3 del receptor de células T, para probar la capacidad del anticuerpo biespecífico para inhibir el crecimiento del tumor en el animal no humano.

EJEMPLOS

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

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

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

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

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

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

45 El ADN de BAC transformado (descrito anteriormente) se usó para someter a electroporación las células ES de ratón para crear células ES modificadas que comprenden un reemplazo de los exones 2 a 4 en un gen endógeno de SIRPα de ratón con un fragmento genómico que comprende los exones 2 a 4 de un gen de SIRPα humano. Las células ES positivas que contienen un fragmento genómico que comprende los exones 2 a 4 de un gen de SIRPα humano se identificaron mediante PCR cuantitativa con el uso de sondas TAQMAN™ (Lie y Petropoulos, 1998. Curr. Opin. Biotechnology 9:43-48). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente arriba incluyó lo siguiente, que indica la secuencia endógena de ratón corriente arriba del punto de inserción (contenida dentro del paréntesis más abajo) unida de manera contigua a una secuencia genómica de SIRPα humana presente en el punto de inserción: (AGCTCTCCTA CCACTAGACT GCTGAGACCC GCTGCTCTGC TCAGGACTCG ATTTCCAGTA CACAATCTCC CTCTTTGAAA AGTACCACAC ATCCTGGGGT) GCTCTTGCAT TTGTGTGACA CTTTGCTAGC CAGGCTCAGT CCTGGGTTCC AGGTGGGGAC TCAAACACAC TGGCAGGAGT CTACATTGGA TATTCTTGGT (Sec. con núm. de ident.: 6) La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente abajo en el extremo 5' del casete de resistencia a neomicina incluyó lo siguiente, que indica una secuencia genómica de SIRPα humana contigua con la secuencia del casete corriente abajo del punto de inserción (contenida dentro del paréntesis más abajo con la secuencia loxP en letras cursivas): GCTCCCCATT CCTCACTGGC CCAGCCCCTC TTCCCTACTC TTTCTAGCCC CTGCCTCATC TCCCTGGCTG CCATTGGGAG CCTGCCCCAC TGGAAGCCAG (TCGAG ATAACCTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT ATGCATGGCC TCCGCGCCGG GTTTTGGCGC CTCCCGCGGG CGCCCCCTC CTCACGGCGA) (Sec. con núm. de ident.: 7) La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente abajo en el extremo 3' del casete de resistencia a neomicina incluyó lo siguiente, que indica la secuencia del casete contigua con la secuencia genómica de ratón en 3' del exón 4 de un gen endógeno de SIRPα (contenida dentro del paréntesis más abajo): CATTCTCAGT ATTGTTTTGC CAAGTTCTAA TTCCATCAGA

CCTCGACCTG CAGCCCCTAG ATAACCTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG TTATGCTAGC (TGTCTCATAG AGGCTGGCGA TCTGGCTCAG GGACAGCCAG TACTGCAAAG AGTATCCTTG TTCATACCTT CTCCTAGTGG CCATCTCCCT GGGACAGTCA) (Sec. con núm. de ident.: 8) Los clones positivos de células ES se usaron después para implantar ratones hembras mediante el uso del método VELOCIMOUSE® (ver, por ejemplo, patente de los Estados Unidos núm. 7,294,754 y Poueymirou 2007, y otros, F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses, Nature Biotech. 25(1):91-99) para generar una camada de crías que contienen una inserción de los exones 2-4 de un gen de SIRP α humano en un gen de SIRP α endógeno de un ratón.

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

Los ratones que portan la construcción del gen de SIRP α humanizado (es decir, que contienen los exones 2 a 4 de SIRP α humana en un gen de SIRP α de ratón) pueden cruzarse con una cepa de ratón Cre deletor (ver, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente Internacional núm. WO 2009/114400) para eliminar cualquier casete de resistencia a neomicina con sitios lox introducidos por el vector de transformación que no se elimina, por ejemplo, en la etapa de célula ES o en el embrión. Opcionalmente, el casete de resistencia a neomicina se mantiene en los ratones.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sumario

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

En este estudio, el efecto de tratamiento con el bsAc CD20xCD3 Ac 1 sobre el crecimiento tumoral de linfoma de células B humanas (Raji) se examinó en un modelo tumoral en ratón. El modelo utilizó ratones BALB/c-Rag2nulo IL2rynulo (BRG) injertados con hCD34+ que se humanizaron para SIRPα. Estos ratones, con células T, B, y NK humanas, así como granulocitos, monocitos, y células dendríticas (DC), se trataron con Ac 1 dos veces a la semana, lo que dio como resultado una supresión significativa del crecimiento de tumores Raji en comparación con el control de vehículo y el AcM control de no unión, Ac 5 Control. El tratamiento con el Ac 1 suprimió el crecimiento tumoral a 0,4 mg/kg y 0,04 mg/kg con un mayor nivel de significación que el grupo control de vehículo a todo lo largo del período de tratamiento ($p < 0,0001$). No se observó una pérdida del peso significativa en ningún grupo de tratamiento. Estos resultados muestran que el Ac 1 se dirige a tumores Raji en ratones con células inmunitarias humanas, lo que da lugar a una supresión tumoral significativa.

Materiales y métodos

Materiales

Compuesto de prueba y anticuerpo control

Compuesto de prueba: Ac 1.

Anticuerpo control: Ac 5 Control.

Reactivos

Tabla 4: Lista de reactivos

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

Reactivo	Fuente	Identificación
Anti-human CD19	BD Biosciences	Catálogo núm. 555412, Clon HIB19
Anti-CD3 humano	Invitrogen	Catálogo núm. MHCD0328, Clon S4.1
Anti-CD14 humano	BD Biosciences	Catálogo núm. 557742, Clon M5E2
Anti-CD45 humano	BD Biosciences	Catálogo núm. 557659, Clon 30-F11
BD Fortessa	BD Biosciences	Instrumento de orden especial

Sistemas de prueba

Los estudios en tumores presentados en este informe emplearon ratones inmunodeficientes BALB/c-Rag2^{fl}IL2^{fl} (BRG) de 24-32 semanas de edad, machos y hembras, humanizados para el gen de la proteína reguladora de señales alfa (SIRP α). Estos se generaron en Regeneron mediante transformación de células madre embrionarias (ES) (Strowig y otros, Proc Natl Acad Sci USA, 108(32): 13218-13223 (2011)). Después del reconocimiento de CD47, SIRP α inhibe el aclaramiento de células CD47 positivas por los macrófagos. Estudios anteriores han demostrado que los ratones BRG que expresan el transgén SIRP α humano tienen un injerto mejorado de HSC humanas (Strowig y otros, Proc Natl Acad Sci USA, 108(32): 13218-13223 (2011)).

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

Diseño experimental

Reconstitución del sistema inmunitario humano en ratones BRG SIRP α

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

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

Procedimiento de estudio de tumores Raji en ratones BRG SIRP α

En el día 0, los grupos de 5 ratones BRG SIRP α recibieron la administración de 2x10⁶ células tumorales Raji por vía subcutánea. El mismo día, los ratones se trataron con una dosis intraperitoneal (IP) de Ac 1 (0,4 o 0,04 mg/kg). Control de AcM control de no unión Ac 5 (que se une un antígeno felino sin reactividad cruzada con CD20 o CD3 humanos) a una dosis de 0,4 mg/kg o vehículo solo. Posteriormente los ratones recibieron dos dosis de anticuerpo/semana durante 4 semanas. El crecimiento tumoral se midió con calibres en los días 3, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30 y 34. Los grupos de estudio se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Resumen de los grupos de tratamiento en ratones BRG SIRPα

Grupos	Tumor	Anticuerpo	Dosis (mg/kg)	Vía	Programa	Cant. de ratones
Grupos control	Raji	Sin anticuerpo (Solo vehículo)	0	IP	2x/wk	5
	Raji	Ac 5 Control	0.4	IP	2x/wk	5
Grupos experimentales	Raji	Ac 1	0.4	IP	2x/wk	5
	Raji	Ac 1	0.04	IP	2x/wk	5

5

10

15 Procedimientos específicos

Preparación de reactivos

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

25 Análisis estadístico

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

35 Resultados

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

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

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

55 Conclusiones

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

65 Equivalentes

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

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

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

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

Las publicaciones, sitios web y otros materiales de referencia referidos en la presente descripción describen los antecedentes de la invención y proporcionan detalles adicionales relacionados con su práctica.

Listado de secuencias

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

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

<130> N405867EP-A

<140> tba

<141> 2014-09-23

<150> 61881261

<151> 2013-09-23

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 4007

<212> ADN

<213> Mus musculus

ES 2 710 282 T3

<400> 1

	gcgctcggcc gggccgccct cgcgctggcc tcgcgacggc tccgcacagc ccgcactcgc	60
5	tctgcgagct gtccccgctc gcgcttgctc tccgatctcc gtccccgctc cctctccctc	120
	ttcctctccc cctctttcct tctccctcgc tatccgctcc cccgcccccg tgccctctggc	180
	tctgcgctc gctccctcgg gtccgctccc ctttcccgcc ggcctggccc ggcgtcacgc	240
10	tcccggagtc tccccgctcg gggcgctctc attgtgggag ggggtcagat cccccgccg	300
	ggcgggtggcg ctggggggca gcggaggggg aggggcctta gtcgttcgcc cgcgccgcc	360
15	gcccgcctgc cgagcgcgct caccgccgct ctcctcctt gctctgcagc cgcggcccat	420
	ggagcccgcc ggcccggccc ctggccgctt agggccgctg ctgctctgcc tgctgctctc	480
	cgctcctgt ttctgtacag gagccacggg gaaggaactg aagggtactc agcctgagaa	540
20	atcagtgtct gttgctgctg gggattcgac cgttctgaac tgcacttga cctccttgtt	600
	gccggtggga cccattaggt ggtacagagg agtagggcca agccggctgt tgatctacag	660
	tttcgcagga gaatacgttc ctgcaattag aaatgtttca gataactacta agagaacaa	720
25	tatggacttt tccatccgta tcagtaatgt caccacagca gatgctggca tctactactg	780
	tgtgaagttc cagaaaggat catcagagcc tgacacagaa atacaatctg gagggggaac	840
	agaggtctat gtactcgcca aaccttctcc accggaggta tccggcccag cagacagggg	900
30	catacctgac cagaaagtga acttcacctg caagtctcat ggcttctctc cccggaatat	960
	caccctgaag tggttcaaag atgggcaaga actccacccc ttggagacca cctgaaccc	1020
35	tagtggaag aatgtctcct acaacatctc cagcacagtc aggggtgtac taaactccat	1080
	ggatgttaat tctaaggcca tctgcgaggt agcccacatc accttgata gaagccctct	1140
	tctggggatt gctaacctgt ctaacttcat ccgagtttca cccaccgtga aggtcaccca	1200
40	acagtccccg acgtcaatga accagggtgaa cctcacctgc cgggctgaga gtttctaccc	1260
	cgaggatctc cagctgatct ggctggagaa tggaaacgta tcacggaatg acacgcccac	1320
	gaatctcaca aagaacacgg atgggaacta taattacaca agcttgttcc tgggtgaactc	1380
45	atctgctcat agagaggaag tgggtttcac gtgccaggtg aagcacgacc aacagccagc	1440
	gatcaccoga aaccatacog tgctgggatt tgcccactog agtgcacaa gtagcatgca	1500
	aaccttccct gataataatg ctaccacaaa ctggaatgtc ttcacoggtg tgggctggc	1560
50	gtgtgctttg ctctagctc tgctgatggc tgctctctac ctctccogga tcaaacagaa	1620
	gaaagccaag gggtaacat ctccacacg gttgcacgag cccgagaaga acgccagga	1680
55	aataaccag atccaggaca caaatgacat caacgacatc acatacgcag acctgaatct	1740
	gcccacagag aagaagccog caccocgggc cctgagcct aacaaccaca cagaatatgc	1800
	aagcattgag acaggcaaag tgccataggcc agaggatacc ctcaactatg ctgacctgga	1860
60	catggtccac ctacagccgg cagaccagc ccccaagcct gagccatctt tctcagagta	1920
	tgctagtgtc caggtccaga ggaagtgaat ggggctgtgg tctgtactag gcccacccc	1980
	cacaagtttt cttgtcctac atggagtggc catgacgagg acatccagcc agccaatcct	2040
65	gtccccagaa ggccaggtgg cacgggtcct agggaccagg gtaaggggtg cctttgtctt	2100

ES 2 710 282 T3

5 cctccgtgg ctcttcaaca cctcttgggc acccacgtcc ccttcttccg gaggctgggt 2160
 gttgcagaac cagagggcga actggagaaa gctgcctgga atccaagaag tgttgtgcct 2220
 10 cggcccatca ctcgtgggtc tggatcctgg tcttggcaac cccaggttgc gtccctgatg 2280
 ttccagagct tggctctctg tgtggagaag agctcaccat ctctacccaa cttagacttt 2340
 gggaccagac tccctttaga tcaaaccgcc ccatctgtgg aagaactaca ccagaagtca 2400
 15 gcaagttttc agccaacagt gctggcctcc ccacctcca ggctgactag cctggggag 2460
 aaggaacctt ctctcctag accagcagag actccctggg catgttcagt gtggccccac 2520
 ctcccttcca gtcccagctt gcttccctca gctagcacta actcagcagc atcgtctctg 2580
 ggacgcctgt aaattattga gaaatgtgaa ctgtgcagtc ttaaagctaa ggtgttagaa 2640
 aatttgattt atgctgttta gttgttgttg ggtttctttt ctttttaatt tctttttctt 2700
 20 ttttgatttt ttttctttcc cttaaaacaa cagcagcagc atcttggctc tttgtcatgt 2760
 gttgaatggt tgggtcttgt gaagtctgag gtctaacagt ttattgtcct ggaaggattt 2820
 tcttacagca gaaacagatt tttttcaaat tcccagaatc ctgaggacca agaaggatcc 2880
 25 ctccagctgt acttccagca cccagcgtca ctgggacgaa ccaggccctg ttcttacaag 2940
 gccacatggc tggccctttg cctccatggc tactgtgtga agtgcagcct tgtctgacct 3000
 aatgctgacc taatgttggc cattccacat tgaggggaca aggtcagtga tgccccctt 3060
 30 cactcacaag cacttcagag gcatgcagag agaagggaca ctggccagc tctctgaggt 3120
 aatcagtgca aggaggagt cgttttttgc cagcaaacct cagcaggatc aacttggaac 3180
 35 agaacctggt catacctgtg acaacacagc tgtgagccag ggcaaaccac ccaactgtcac 3240
 tggctcgaga gtctgggcag aggcctctgac cctccacct ttaaactgga tgccggggcc 3300
 tggctgggcc caatgccaag tggttatggc aacctgact atctggtctt aacatgtagc 3360
 40 tcaggaagtg gaggcgctaa tgtccccaat cctggggat tcttgattcc agctattcat 3420
 gtaagcagag ccaacctgcc tatttctgta ggtgcgactg ggatgttagg agcacagcaa 3480
 45 ggacctagct ctgtagggtt ggtgacctga tacttctcat aatggcatct agaagttagg 3540
 ctgagttggc ctcaactggc cagcaaacca gaacttctct ttgtccgggc catgttcttg 3600
 ggctgtcttc taattccaaa gggttgggtg gtaaagctcc accccttct cctctgcta 3660
 50 aagacatcac atgtgtatac acacacgggt gtatagatga gttaaaagaa tgcctcgtct 3720
 ggcacctaata ttttgtctta agtttttttg gagggagaaa ggaacaaggc aaggaagat 3780
 gtgtagcttt ggctttaaacc aggcagcctg ggggctccca agcctatgga acctggtag 3840
 55 aaagaagaga acagaagcgc cctgtgagga gtgggatttg tttttctgta gaccagatga 3900
 gaaggaacaa ggcctgttt tgtacatagt tgcaacttaa aatttttggc ttgcaaaata 3960
 60 tttttgtaat aaagatttct gggttaacaat aaaaaaaaa aaaaaaa 4007

<210> 2

<211> 509

<212> PRT

ES 2 710 282 T3

<213> Mus musculus

<400> 2

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

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

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

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

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

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

35 Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Ser Asn Val Thr
100 105 110

40 Pro Ala Asp Ala Gly Ile Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Gln Lys Gly Ser
115 120 125

45 Ser Glu Pro Asp Thr Glu Ile Gln Ser Gly Gly Gly Thr Glu Val Tyr
130 135 140

50 Val Leu Ala Lys Pro Ser Pro Pro Glu Val Ser Gly Pro Ala Asp Arg
145 150 155 160

55 Gly Ile Pro Asp Gln Lys Val Asn Phe Thr Cys Lys Ser His Gly Phe
165 170 175

60 Ser Pro Arg Asn Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asp Gly Gln Glu Leu
180 185 190

65 His Pro Leu Glu Thr Thr Val Asn Pro Ser Gly Lys Asn Val Ser Tyr
195 200 205

70 Asn Ile Ser Ser Thr Val Arg Val Val Leu Asn Ser Met Asp Val Asn
210 215 220

ES 2 710 282 T3

5 Ser Lys Val Ile Cys Glu Val Ala His Ile Thr Leu Asp Arg Ser Pro
 225 230 235 240

10 Leu Arg Gly Ile Ala Asn Leu Ser Asn Phe Ile Arg Val Ser Pro Thr
 245 250 255

15 Val Lys Val Thr Gln Gln Ser Pro Thr Ser Met Asn Gln Val Asn Leu
 260 265 270

20 Thr Cys Arg Ala Glu Arg Phe Tyr Pro Glu Asp Leu Gln Leu Ile Trp
 275 280 285

25 Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Asn Asp Thr Pro Lys Asn Leu Thr
 290 295 300

30 Lys Asn Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Tyr Thr Ser Leu Phe Leu Val Asn
 305 310 315 320

35 Ser Ser Ala His Arg Glu Asp Val Val Phe Thr Cys Gln Val Lys His
 325 330 335

40 Asp Gln Gln Pro Ala Ile Thr Arg Asn His Thr Val Leu Gly Phe Ala
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

ES 2 710 282 T3

5 Ser Lys Val Ile Cys Glu Val Ala His Ile Thr Leu Asp Arg Ser Pro
 225 230 235 240

10 Leu Arg Gly Ile Ala Asn Leu Ser Asn Phe Ile Arg Val Ser Pro Thr
 245 250 255

15 Val Lys Val Thr Gln Gln Ser Pro Thr Ser Met Asn Gln Val Asn Leu
 260 265 270

20 Thr Cys Arg Ala Glu Arg Phe Tyr Pro Glu Asp Leu Gln Leu Ile Trp
 275 280 285

25 Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Asn Asp Thr Pro Lys Asn Leu Thr
 290 295 300

30 Lys Asn Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Tyr Thr Ser Leu Phe Leu Val Asn
 305 310 315 320

35 Ser Ser Ala His Arg Glu Asp Val Val Phe Thr Cys Gln Val Lys His
 325 330 335

40 Asp Gln Gln Pro Ala Ile Thr Arg Asn His Thr Val Leu Gly Phe Ala
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

ES 2 710 282 T3

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

5

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

10

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

15

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

<210> 3

20

<211> 4201

<212> ADN

25

<213> Homo sapiens

<400> 3

30

tccggcccgc acccaccccc aagagggggc ttcagctttg gggctcagag gcacgacctc 60

ctggggaggg ttaaaaggca gacgcccccc cgcccccgc gccccgcgc cccgactcct 120

tgcgcgctc cagcctctcg ccagtgggaa gcggggagca gccgcgcgc cggagtccgg 180

35

aggcgagggg aggtcgcccg caacttcccc ggtccacctt aagaggacga tgtagccagc 240

tgcagcgct gaccttagaa aaacaagttt gcgcaaagtg gagcggggac ccggcctctg 300

40

ggcagccccg gggcgcttc cagtgccttc cagccctcgc gggcggcgca gccgcggccc 360

atggagcccg ccggccccgc ccccggcgc ctcggggcgc tgctctgcct gctgctcgcc 420

45

50

55

60

65

ES 2 710 282 T3

	gcgtcctgcg cctggtcagg agtggcgggt gaggaggagc tgcaggatgat tcagcctgac	480
	aatcccggtg tggttgcagc tggagagaca gccactctgc gctgcactgc gacctctctg	540
5	atccctgtgg ggcccatcca gtggttcaga ggagctggac caggccggga attaatactac	600
	aatcaaaaag aaggccactt cccccggta acaactgttt cagacctcac aaagagaaac	660
	aacatggact tttccatccg catcggtaac atcaccocag cagatgccgg cacctactac	720
10	tgtgtgaagt tccggaaagg gagccccgat gacgtggagt ttaagtctgg agcaggcact	780
	gagctgtctg tgcgcgccaa accctctgcc cccgtggtat cgggcctgc ggcgagggcc	840
	acacctcagc acacagtgag cttcacctgc gagtcccaag gcttctcacc cagagacatc	900
15	accctgaaat ggttcaaaaa tgggaatgag ctctcagact tccagacca cgtggacccc	960
	gtaggagaga gcgtgtccta cagcatccac agcacagcca aggtggtgct gaccocgag	1020
20	gacgttcaact ctcaagtcac ctgcgaggtg gccacgtca ccttgcaggg ggaccctctt	1080
	cgtgggactg ccaacttgtc tgagaccatc cgagttccac ccaccttga ggttactcaa	1140
	cagcccgtga gggcagagaa ccaggtgaat gtcacctgcc aggtgaggaa gttctacccc	1200
25	cagagactac agctgacctg gttggagaat ggaacgtgt cccggacaga aacggcctca	1260
	accgttacag agaacaagga tggtaacctac aactggatga gctggctcct ggtgaatgta	1320
30	tctgccaca gggatgatgt gaagctcacc tgccaggtg agcatgacgg gcagccagcg	1380
	gtcagcaaaa gccatgacct gaaggtctca gccaccocga aggagcaggg ctcaataacc	1440
	gccgctgaga aactggatc taatgaacgg aacatctata ttgtggtggg tgtggtgtgc	1500
35	accttgcctg tggccctact gatggcggcc ctctacctcg tccgaatcag acagaagaaa	1560
	gccagggct ccacttctc tacaaggttg catgagcccg agaagaatgc cagagaaata	1620
	acacaggaca caaatgatat cacatatgca gacctgaacc tgcccagggg gaagaagcct	1680
40	gctccccagg ctgcccagcc caacaaccac acggagtatg ccagcattca gaccagcccg	1740
	cagcccgcgt cggaggacac cctcacctat gctgacctgg acatggtcca cctcaaccgg	1800
	acccccagc agccggcccc caagcctgag ccgtccttct cagagtacgc cagcgtccag	1860
45	gtcccagagg agtgaatggg accgtggttt gctctagcac ccatctctac gcgcttctt	1920
	gtcccacagg gagccgccgt gatgagcaca gccaacccag tcccggagg gctggggcgg	1980
50	tgcaggctct gggaccocagg gccaggggtg gctcttctct ccccaccct ccttggctct	2040
	ccagcacttc ctgggcagcc aaggccccct cccccacat tgccacatac ctggaggctg	2100
	acgttgccaa accagccagg gaaccaacct gggaggtggc cagaactgcc tggggtccaa	2160
55	gaactcttgt gcctccgtcc atcaccatgt gggttttgaa gacctcagc tgctccccg	2220
	atgctccgaa gcctgatctt ccaggggtggg gaggagaaaa tcccacctcc cctgacctcc	2280
60	accacctcca ccaccaccac caccaccacc accaccacta ccaccaccac ccaactgggg	2340
65		

ES 2 710 282 T3

5 ctagagtggg gaagatttcc ccttttagatc aaactgcccc ttccatggaa aagctggaaa 2400
 aaaactctgg aaccatatac caggcttggg gaggttgctg ccaacagtcc tggcctcccc 2460
 10 catccctagg ctaaagagcc atgagtcctg gaggaggaga ggaccctcc caaaggactg 2520
 gagacaaaac cctctgcttc cttgggtccc tccaagactc cctggggccc aactgtgttg 2580
 ctccaccggg acccatctct ccttctaga cctgagcttg ccctccagc tagcactaag 2640
 caacatctcg ctgtggaagc ctgtaaatta ctgagaaatg tgaaacgtgc aatcttgaaa 2700
 ctgaggtggt agaaaacttg atctgtggtg ttttgtttg tttttttct taaaacaaca 2760
 15 gcaacgtgat cttggctgtc tgtcatgtgt tgaagtccat ggttgggtct tgtgaagtct 2820
 gaggtttaac agtttgttgt cctggagggg ttttcttaca gcaagactt gagttcctcc 2880
 aagtcccaga accccaagaa tgggcaagaa ggatcaggtc agccactccc tggagacaca 2940
 20 gccttctggc tgggactgac ttggccatgt tctcagctga gccacgggc tggtagtgca 3000
 gccttctgtg accccgctgt ggtaagtcca gcctgccag ggctgctgag ggctgcctct 3060
 tgacagtgca gtcttatoga gacccaatgc ctcagtctgc tcatccgtaa agtggggata 3120
 25 gtgaagatga cccccctccc caccacctct cataagcact ttaggaacac acagagggta 3180
 gggatagtgg ccttggcctg ctatcctacc cctttagtga ccgccccat ccggcttcc 3240
 tgagctgac cttgaagaag aaatcttcca tttctgctct caaacctac tgggatcaaa 3300
 30 ctggaataaa ttgaagacag ccaggggat ggtgcagctg tgaagctcgg gctgattccc 3360
 cctctgtccc agaaggttgg ccagaggggtg tgaccagtt acccttaac ccccacctt 3420
 35 ccagtgggt gtgagggcct gaccgggccc agggcaagca gatgtcgcaa gccctattta 3480
 ttcagtcttc actataactc ttagagtga gacgctaag ttcagtactc ctggccttgg 3540
 gatgccaag ggatttctgg ctcaggctgt aaaagtact gagccatcct gccattcct 3600
 40 ggaggtccta caggtgaaac tgcaggagct cagcatagac ccagctctct ggggatggg 3660
 cacctggtga tttcaatgat ggcacccagg aattagctga gccaacagac catgtggaca 3720
 gctttggcca gagctccgt gtggcatctg ggagccacag tgaccagcc acctggctca 3780
 45 ggctagtcc aaattccaaa agattggctt gtaaaccttc gtctccctct ctttaacca 3840
 gagacagcac atacgtgtgc acacgcatgc acacacacat tcagtatctt aaaagaatgt 3900
 50 tttcttgggt ccattttcat tttattttat tttttaatte ttggaggggg aaataaggga 3960
 ataaggccaa ggaagatgta tagctttagc tttagcctgg caacctggag aatccacata 4020
 ccttgtgtat tgaaccccag gaaaaggaag agtogaacc aacctgcgg aaggagcatg 4080
 55 gtttcaggag tttattttaa gactgctggg aaggaaacag gccccatctt gtatatagtt 4140
 gcaacttaaa ctttttggtc tgcaaaatat ttttgaata aagattctg ggtaataatg 4200
 a 4201

60 <210> 4
 <211> 504
 65 <212> PRT

ES 2 710 282 T3

<213> Homo sapiens
<400> 4

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

10 Leu Leu Leu Ala Ala Ser Cys Ala Trp Ser Gly Val Ala Gly Glu Glu
20 25 30

15 Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala Ala Gly
35 40 45

20 Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro Val Gly
50 55 60

25 Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu Ile Tyr
65 70 75 80

30 Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser Asp Leu
85 90 95

35 Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn Ile Thr
100 105 110

40 Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys Gly Ser
115 120 125

45 Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser Val
130 135 140

50 Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala Arg Ala
145 150 155 160

55 Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly Phe Ser
165 170 175

60 Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Ser
180 185 190

65 Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser Tyr Ser
195 200 205

Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val His Ser

ES 2 710 282 T3

	210		215		220														
5	Gln	Val	Ile	Cys	Glu	Val	Ala	His	Val	Thr	Leu	Gln	Gly	Asp	Pro	Leu			
	225					230					235					240			
10	Arg	Gly	Thr	Ala	Asn	Leu	Ser	Glu	Thr	Ile	Arg	Val	Pro	Pro	Thr	Leu			
					245					250					255				
15	Glu	Val	Thr	Gln	Gln	Pro	Val	Arg	Ala	Glu	Asn	Gln	Val	Asn	Val	Thr			
				260					265					270					
20	Cys	Gln	Val	Arg	Lys	Phe	Tyr	Pro	Gln	Arg	Leu	Gln	Leu	Thr	Trp	Leu			
			275					280					285						
25	Glu	Asn	Gly	Asn	Val	Ser	Arg	Thr	Glu	Thr	Ala	Ser	Thr	Val	Thr	Glu			
		290					295					300							
30	Asn	Lys	Asp	Gly	Thr	Tyr	Asn	Trp	Met	Ser	Trp	Leu	Leu	Val	Asn	Val			
	305					310					315				320				
35	Ser	Ala	His	Arg	Asp	Asp	Val	Lys	Leu	Thr	Cys	Gln	Val	Glu	His	Asp			
				325						330					335				
40	Gly	Gln	Pro	Ala	Val	Ser	Lys	Ser	His	Asp	Leu	Lys	Val	Ser	Ala	His			
				340					345					350					
45	Pro	Lys	Glu	Gln	Gly	Ser	Asn	Thr	Ala	Ala	Glu	Asn	Thr	Gly	Ser	Asn			
			355					360						365					
50	Glu	Arg	Asn	Ile	Tyr	Ile	Val	Val	Gly	Val	Val	Cys	Thr	Leu	Leu	Val			
		370					375					380							
55	Ala	Leu	Leu	Met	Ala	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Arg	Ile	Arg	Gln	Lys	Lys			
	385					390					395				400				
60	Ala	Gln	Gly	Ser	Thr	Ser	Ser	Thr	Arg	Leu	His	Glu	Pro	Glu	Lys	Asn			
				405						410					415				
65	Ala	Arg	Glu	Ile	Thr	Gln	Asp	Thr	Asn	Asp	Ile	Thr	Tyr	Ala	Asp	Leu			
				420					425					430					
70	Asn	Leu	Pro	Lys	Gly	Lys	Lys	Pro	Ala	Pro	Gln	Ala	Ala	Glu	Pro	Asn			
			435					440					445						
75	Asn	His	Thr	Glu	Tyr	Ala	Ser	Ile	Gln	Thr	Ser	Pro	Gln	Pro	Ala	Ser			
		450					455					460							

ES 2 710 282 T3

5 Glu Asp Thr Leu Thr Tyr Ala Asp Leu Asp Met Val His Leu Asn Arg
 465 470 475 480

 10 Thr Pro Lys Gln Pro Ala Pro Lys Pro Glu Pro Ser Phe Ser Glu Tyr
 485 490 495

 15 Ala Ser Val Gln Val Pro Arg Lys
 500

 <210> 5
 <211> 508
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

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

 30 Cys Leu Leu Leu Ser Ala Ser Cys Phe Cys Thr Gly Val Ala Gly Glu
 20 25 30

 35 Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala Ala
 35 40 45

 40 Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro Val
 50 55 60

 45 Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu Ile
 65 70 75 80

 50 Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser Asp
 85 90 95

 55 Leu Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn Ile
 100 105 110

 60 Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys Gly
 115 120 125

 65 Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser
 130 135 140

 70 Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala Arg
 145 150 155 160

 75 Ala Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly Phe
 165 170 175

ES 2 710 282 T3

5
 Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu
 180 185 190

10
 Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser Tyr
 195 200 205

15
 Ser Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val His
 210 215 220

20
 Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp Pro
 225 230 235 240

25
 Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro Thr
 245 250 255

30
 Leu Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn Val
 260 265 270

35
 Thr Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr Trp
 275 280 285

40
 Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val Thr
 290 295 300

45
 Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val Asn
 305 310 315 320

50
 Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu His
 325 330 335

55
 Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser Ala
 340 345 350

60
 His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Asp Asn Asn Ala Thr
 355 360 365

65
 His Asn Trp Asn Val Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Cys Ala Leu Leu
 370 375 380

70
 Val Val Leu Leu Met Ala Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Ile Lys Gln Lys
 385 390 395 400

75
 Lys Ala Lys Gly Ser Thr Ser Ser Thr Arg Leu His Glu Pro Glu Lys
 405 410 415

80
 Asn Ala Arg Glu Ile Thr Gln Ile Gln Asp Thr Asn Asp Ile Asn Asp
 420 425 430

ES 2 710 282 T3

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

5

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

10

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

15

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

20

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

<210> 6

<211> 200

25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 6

35

```

agctctccta ccactagact gctgagaccc gctgctctgc tcaggactcg atttccagta      60
cacaatctcc ctctttgaaa agtaccacac atcctggggg gctcttgcac ttgtgtgaca      120
ctttgctagc caggctcagt cctgggttcc aggtggggac tcaaacacac tggcacagagt      180
ctacattgga tattcttggt                                     200
    
```

45

<210> 7

<211> 199

<212> ADN

50

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

55

<400> 7

60

```

gctccccatt cctcactggc ccagcccctc ttcctactc tttctagccc ctgcctcacc      60
tccctggctg ccattgggag cctgccccac tggaagccag tcgagataac ttogtataat      120
gtatgctata cgaagttata tgcattggcct ccgcgcgggg ttttgccgcc tcccgggggc      180
gccccctcc tcacggcga                                     199
    
```

65

REIVINDICACIONES

1. Un roedor cuyo genoma comprende un reemplazo de los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α de roedor en un locus endógeno de SIRP α de roedor con los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α humano para formar un gen de SIRP α humanizado, en donde dicho gen de SIRP α humanizado se une operativamente a un promotor de SIRP α de roedor en dicho locus endógeno de SIRP α de roedor, y expresa en dicho roedor una proteína SIRP α humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína SIRP α humana codificada por dicho gen de SIRP α humano y una porción intracelular de la proteína SIRP α de roedor codificada por dicho gen de SIRP α de roedor.
2. El roedor de conformidad con la reivindicación 1, en donde el gen de SIRP α humanizado comprende los exones 1, 5, 6, 7 y 8 de dicho gen de SIRP α de roedor.
3. El roedor de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha proteína SIRP α humana comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la sec. con núm. de ident.: 4.
4. El roedor de conformidad con la reivindicación 3, en donde dicha proteína SIRP α humanizada comprende los residuos de aminoácidos 28-362 de la sec. con núm. de ident.: 4.
5. El roedor de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el roedor no expresa una proteína SIRP α de roedor.
6. Un tejido o célula de roedor aislada cuyo genoma comprende un reemplazo de los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α de roedor en un locus endógeno de SIRP α de roedor con los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α humano para formar un gen de SIRP α humanizado, en donde dicho gen de SIRP α humanizado se une operativamente a un promotor de SIRP α de roedor en dicho locus endógeno de SIRP α de roedor, y codifica una proteína SIRP α humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína SIRP α humana codificada por dicho gen de SIRP α humano y una porción intracelular de la proteína SIRP α de roedor codificada por dicho gen de SIRP α de roedor.
7. La célula o tejido aislados de conformidad con la reivindicación 6, en donde el gen de SIRP α humanizado comprende los exones 1, 5, 6, 7 y 8 de dicho gen de SIRP α de roedor.
8. La célula o tejido aislados de conformidad con la reivindicación 6 u 7, en donde la célula o tejido no expresa una proteína SIRP α de roedor.
9. La célula de roedor aislada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en donde la célula de roedor es una célula madre embrionaria de roedor.
10. Un método para obtener un roedor, que comprende:
 (a) reemplazar los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α de roedor en un locus endógeno de SIRP α de roedor en una célula ES de roedor con los exones 2, 3 y 4 de un gen de SIRP α humano para formar un gen de SIRP α humanizado, en donde dicho gen de SIRP α humanizado se une operativamente a un promotor de SIRP α de roedor en dicho locus endógeno de SIRP α de roedor, y codifica una proteína SIRP α humanizada que comprende una porción extracelular de la proteína SIRP α humana codificada por dicho gen de SIRP α humano y una porción intracelular de la proteína SIRP α de roedor codificada por dicho gen de SIRP α de roedor, para obtener de esta manera una célula ES modificada de roedor que comprende dicho gen de SIRP α humanizado;
 y
 (b) crear un roedor con el uso de la célula ES modificada obtenida en (a).
11. El método de conformidad con la reivindicación 10, en donde el gen de SIRP α humanizado comprende los exones 1, 5, 6, 7 y 8 de dicho gen de SIRP α de roedor.
12. El método de conformidad con la reivindicación 10 u 11, en donde dicha proteína SIRP α humana comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la sec. con núm. de ident.: 4.
13. El roedor de conformidad con la reivindicación 12, en donde dicha proteína SIRP α humanizada comprende los residuos de aminoácidos 28-362 de la sec. con núm. de ident.: 4.
14. Un método para evaluar la eficacia terapéutica de un fármaco para dirigirse a células humanas, que comprende:
 (a) proporcionar un roedor de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el cual se han trasplantado una o más células humanas;
 (b) administrar un candidato a fármaco a dicho roedor; y
 (c) monitorear las células humanas en el roedor para determinar la eficacia terapéutica del candidato a fármaco.

15. El roedor de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, la células o tejidos de roedor asilado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 6-9 o el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en donde el roedor es una rata.

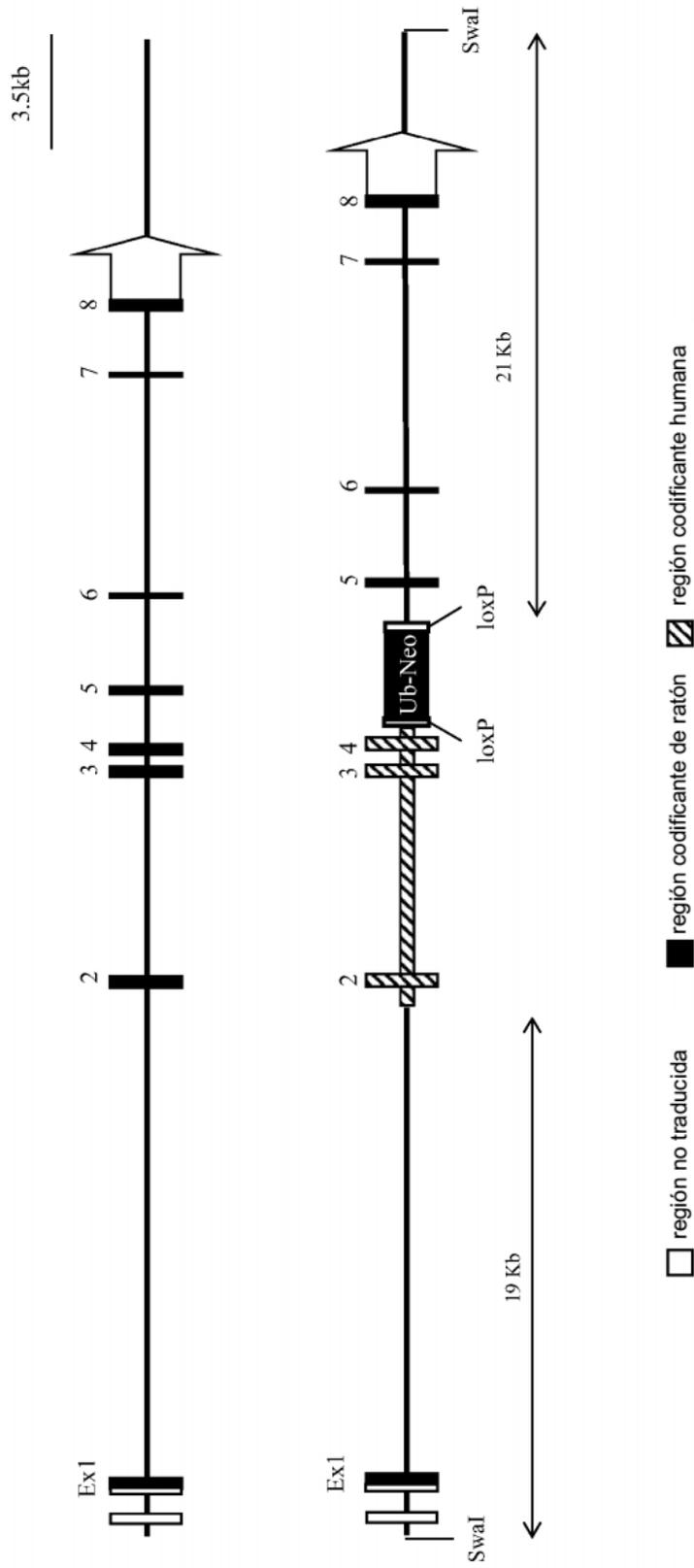


Figura 1

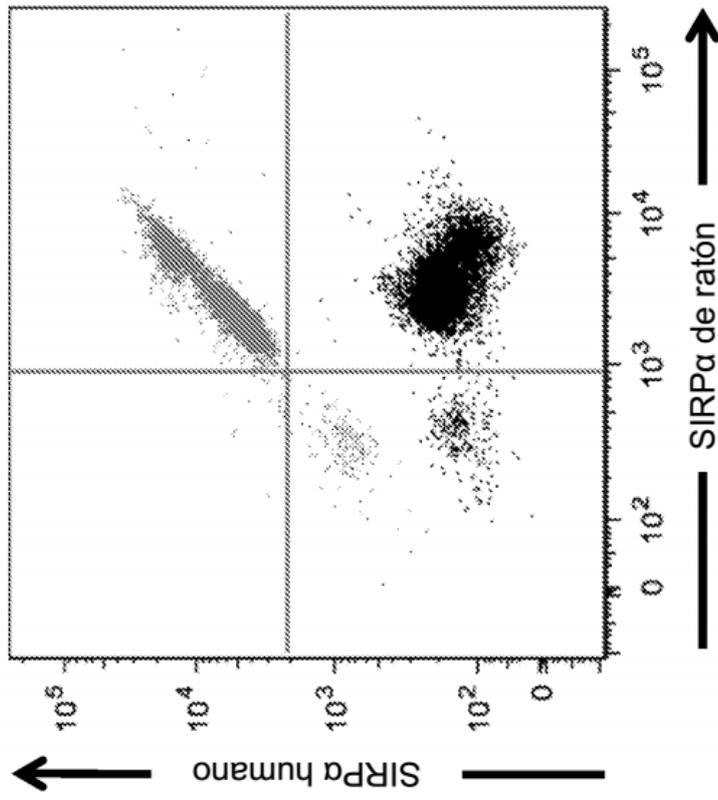


Figura 2

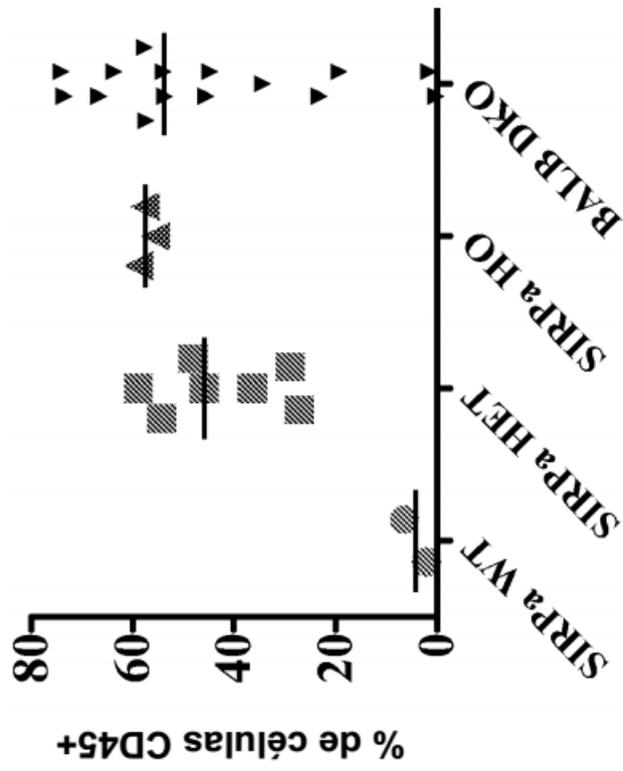


Figura 3

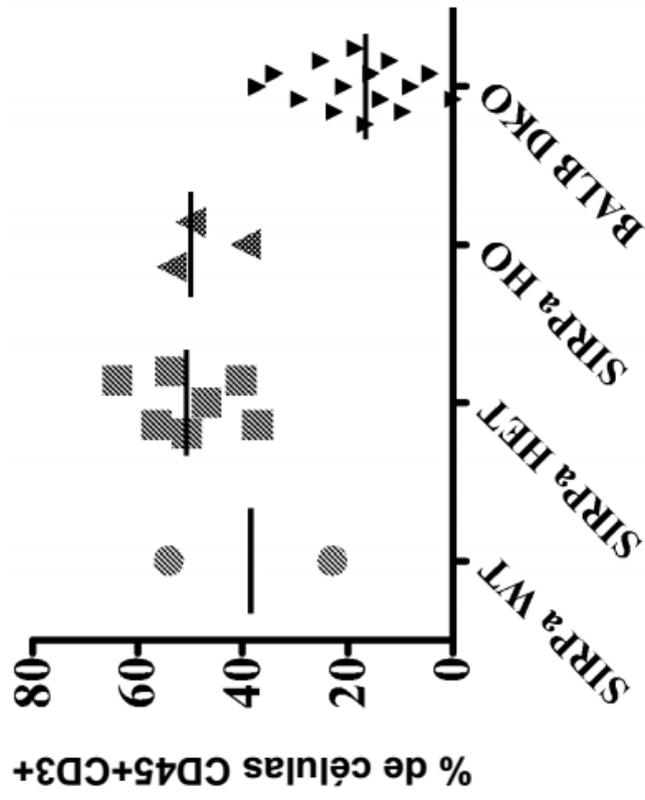


Figura 4

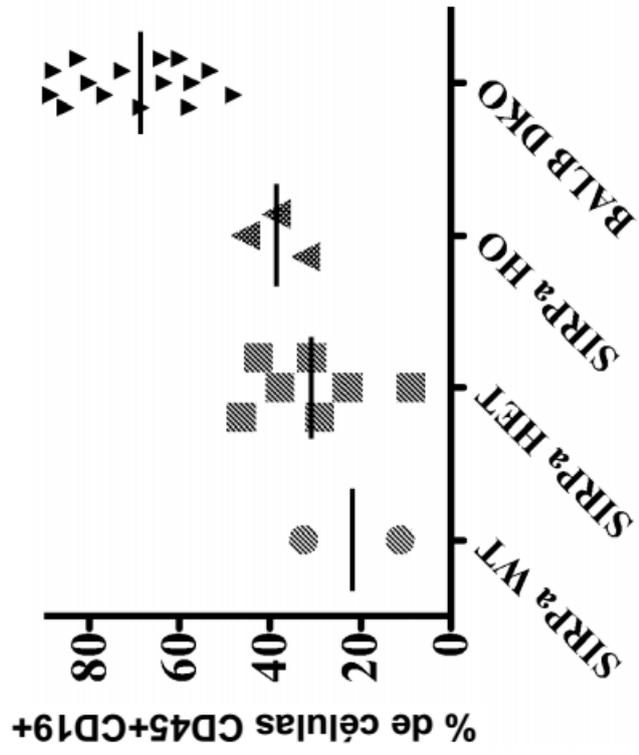


Figura 5

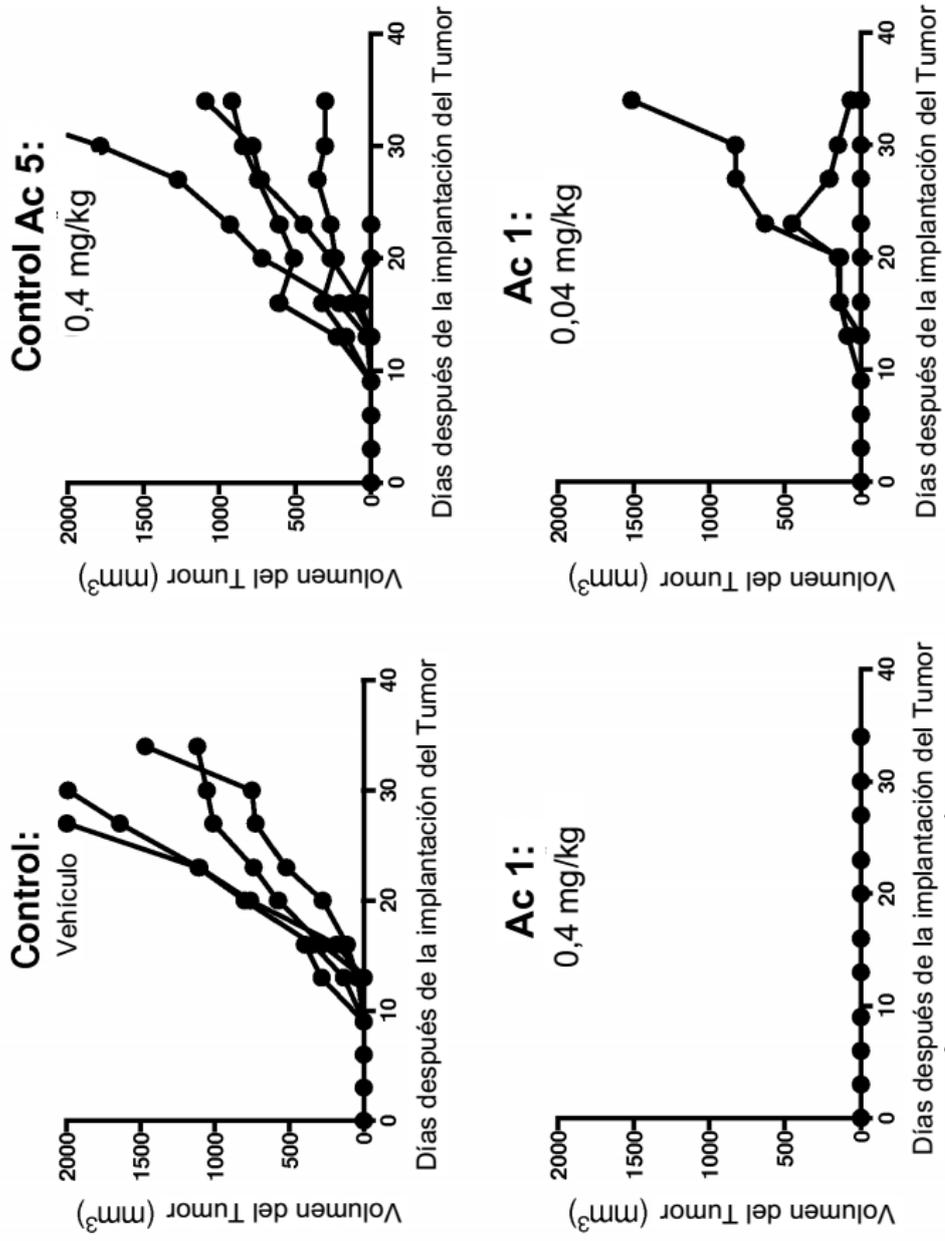


Figura 6

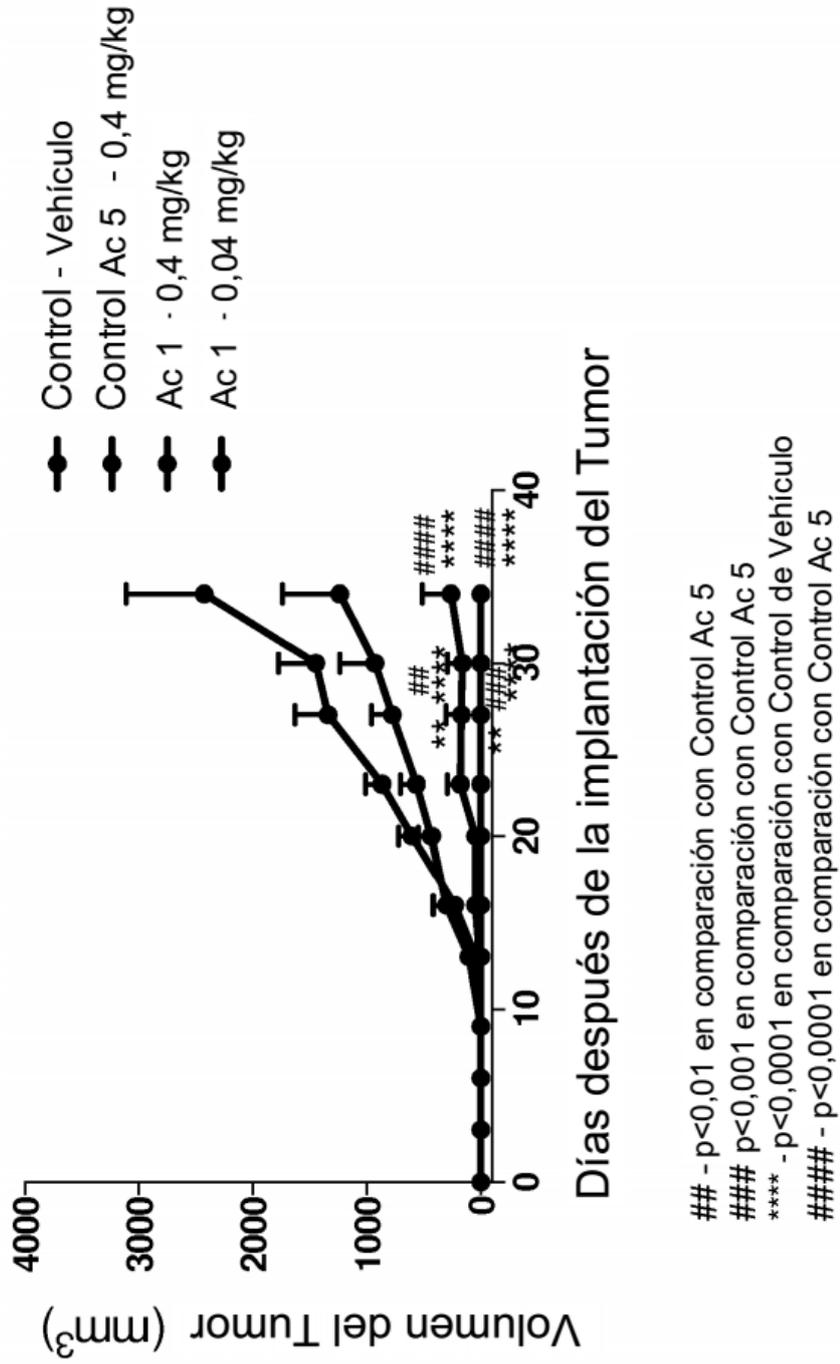


Figura 7

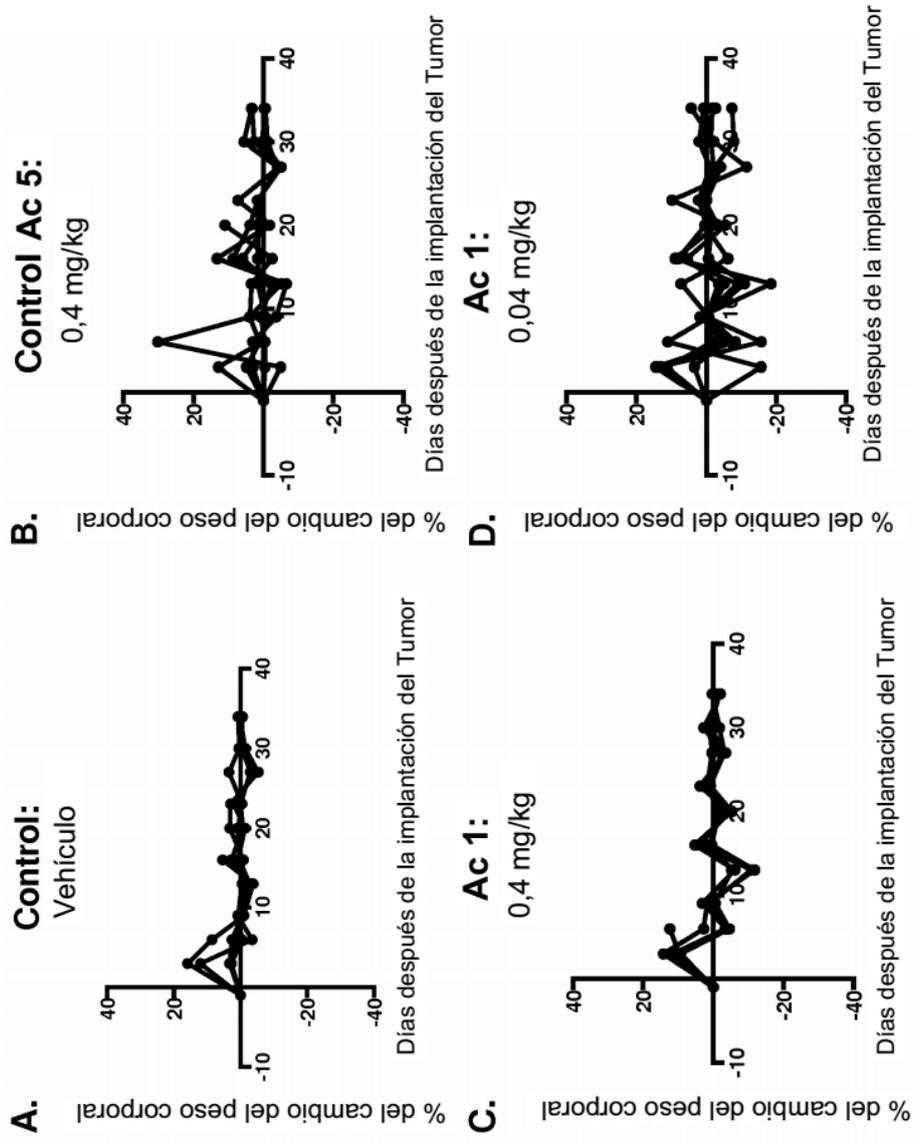


Figura 8