

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 052**

51 Int. Cl.:

C07K 14/73 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2014 PCT/US2014/017395**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14130671**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2014 E 14708430 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2958938**

54 Título: **Ratones que expresan co-receptores humanizados de células T**

30 Prioridad:

20.02.2013 US 201361766762 P
15.10.2013 US 201361890915 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MACDONALD, LYNN;
MURPHY, ANDREW, J.;
TU, NAXIN;
VORONINA, VERA y
GURER, CAGAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 736 052 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ratones que expresan co-receptores humanizados de células T

5 Listado de secuencias

La presente memoria descriptiva hace referencia a un listado de secuencias presentado en forma electrónica como un archivo .txt ascii nombrado "2010794-0441_ST25" el 20 de febrero de 2014. El archivo .txt se generó el 13 de febrero de 2014 y tiene 47 kb de tamaño.

10

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata que están genéticamente diseñados para expresar un co-receptor de células T humanizado. La invención se refiere a un roedor diseñado para co-expresar un co-receptor de CD4 humanizado y un Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) II humanizado. La invención se refiere además a un roedor diseñado para co-expresar un co-receptor CD8 humanizado y un MHC I humanizado. También se proporcionan métodos para fabricar un roedor genéticamente modificado que expresa un co-receptor de células T humanizado (por ejemplo, CD4 o CD8 humanizado). También se describen métodos para usar los animales genéticamente modificados que expresan co-receptores de células T humanizadas para desarrollar productos terapéuticos humanos.

20

Antecedentes de la invención

En la respuesta inmune adaptativa, se reconocen antígenos extraños por las moléculas receptoras en los linfocitos B (por ejemplo, inmunoglobulinas) y linfocitos T (por ejemplo, receptor de linfocitos T o TCR). Estos antígenos extraños se presentan sobre la superficie de células como fragmentos peptídicos mediante proteínas especializadas, denominadas genéricamente moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Durante una respuesta mediada por células T, los antígenos presentados por las moléculas del MHC se reconocen por un receptor de células T. Sin embargo, para una respuesta inmune eficaz se requiere más que el reconocimiento del receptor de células T del complejo MHC-antígeno. También se requiere la unión de una molécula co-receptora de células T (por ejemplo, CD4 o CD8) a una porción invariable del MHC.

25

30

Las células T vienen en varias variedades, incluyendo células T auxiliares y células T citotóxicas. Las células T auxiliares expresan el correceptor CD4 y reconocen los antígenos unidos a moléculas del MHC II. Las células T CD4 + activan otras células efectoras en el sistema inmunológico, por ejemplo, activan las células B que expresan MHC II para producir anticuerpos, activan los macrófagos que expresan MHC II para destruir patógenos, etc. La unión del receptor de CD4 y células T al mismo antígeno extraño presentado por el MHC II hace que una célula T sea significativamente más sensible a ese antígeno.

35

40

En cambio, las células T citotóxicas (CTL) expresan el co-receptor CD8 y reconocen antígenos extraños unidos a moléculas del MHC I. Las CTL están especializadas en destruir cualquier célula que lleve un péptido unido al MHC I reconocido por su propio TCR unido a membrana. Cuando una célula muestra péptidos derivados de proteínas celulares no presenta normalmente (por ejemplo, de origen vírico, tumoral o de otro origen no propio), tales péptidos se reconocen mediante los CTL, que se activan y destruyen la célula que muestra el péptido. Similar a CD4, la acción de CD8 hace que las CTL sean más sensibles al antígeno presentado por MHC I.

45

No todos los antígenos provocarán la activación de linfocitos T debido a los mecanismos de tolerancia. Sin embargo, en algunas enfermedades (por ejemplo, cáncer, enfermedades autoinmunes) los péptidos derivados de algunas autoproteínas se convierten en la diana del componente celular del sistema inmune, lo que resulta en la destrucción de las células que presentan tales péptidos. Ha habido un avance significativo en el reconocimiento de antígenos que son clínicamente significativos (por ejemplo, antígenos asociados a diversos tipos de cáncer). Sin embargo, para mejorar la identificación y la selección de péptidos que provocarán una respuesta adecuada en una célula T humana, en particular, para péptidos de antígenos clínicamente significativos, permanece la necesidad de sistemas *in vivo* e *in vitro* que imiten aspectos del sistema inmune humano. Por lo tanto, existe la necesidad de sistemas biológicos (por ejemplo, células y animales no humanos genéticamente modificados) que puedan mostrar componentes de un sistema inmune humano.

50

55

El documento US 2007/0209083 describe ratones transgénicos en los que las moléculas co-receptoras de MHC y células T que interactúan están parcialmente humanizadas.

60

Sumario de la invención

Se proporcionan roedores que comprenden células no humanas que expresan moléculas humanas o humanizadas que funcionan en la respuesta inmune celular.

65

Se proporciona en el presente documento un roedor genéticamente modificado, que comprende en su genoma una

secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de co-receptor de células T humano o humanizado. En diversas realizaciones, se proporciona en el presente documento un roedor genéticamente modificado, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de co-receptor de células T humano/roedor quimérico. La secuencia de nucleótidos está presente en un locus co-receptor endógeno de células T. En una
 5 realización, una porción humana del polipéptido de co-receptor de células T quimérico comprende todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un correceptor de células T humanas y el roedor expresa un polipéptido de co-receptor de células T quimérico funcional. La parte de roedor del polipéptido co-receptor de células T quimérico comprende al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un co-receptor de células T de roedor y el roedor expresa un polipéptido co-receptor de células T quimérico funcional. En un aspecto de la invención, el
 10 polipéptido del co-receptor de células T quimérico se expresa solo en las células T del roedor, por ejemplo, no se expresa en las células B del roedor. El roedor no expresa un co-receptor funcional de células T de roedores de su locus endógeno de co-receptor de células T de roedor. En un aspecto de la invención, El polipéptido de co-receptor de células T quimérico está comprendido en la línea germinal del roedor. En un aspecto, el roedor comprende en el locus co-receptor de células T endógenas una o dos copias de una secuencia de nucleótidos que codifica el
 15 polipéptido co-receptor de células T quiméricas; de esta manera, el roedor puede ser heterocigoto u homocigoto para la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de co-receptor de células T quimérico.

En una realización, El co-receptor de células T es CD4. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un roedor modificado genéticamente que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/roedor quimérico. La secuencia de nucleótidos está presente en un locus CD4 endógeno. El roedor, es por ejemplo, un ratón o una rata. Por lo tanto, en una realización, se proporciona un ratón modificado genéticamente que comprende en su locus CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico, en donde una porción humana del polipéptido CD4 quimérico comprende todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un polipéptido CD4 humano, en donde una porción de ratón del polipéptido CD4 quimérico
 25 comprende al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido de CD4 de ratón, y en donde el ratón expresa un CD4 humano/ratón quimérico funcional. En una realización, se proporciona en el presente documento un ratón modificado genéticamente que comprende en su locus CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende al menos todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3 de un polipéptido CD4 humano, en donde una porción de ratón del polipéptido quimérico comprende al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido de CD4 de ratón, y en donde el ratón expresa un CD4 humano/ratón quimérico funcional. El ratón no expresa un CD4 endógeno funcional a partir de su locus CD4 de ratón endógeno. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico está enlazada operativamente a un promotor de ratón endógeno y a secuencias reguladoras. Por lo tanto, en una realización, el
 30 ratón no expresa la proteína CD4 quimérica en células B o células T de linaje CD8. En una realización, la porción humana de la proteína CD4 quimérica comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 57. En una realización, el polipéptido CD4 humano/ratón quimérico se expone en la SEQ ID NO: 4.

El roedor modificado genéticamente, por ejemplo, el ratón genéticamente modificado, que comprende un polipéptido CD4 quimérico descrito en el presente documento comprende además una proteína MHC II humanizada, en donde la proteína MHC II comprende un dominio extracelular de un polipéptido MHC II α humano y un dominio extracelular de un polipéptido MHC II β humano. En una realización, el animal es un ratón y el ratón comprende en el locus del MHC II endógeno (1) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido MHC II α humano/ratón quimérico, en donde una porción humana del polipéptido MHC II α comprende un dominio extracelular de un MHC II α humano y dominios transmembrana y citoplásmicos del polipéptido MHC II α endógeno de ratón, y (2) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC II β humano quimérico/de ratón, en donde una porción humana del polipéptido MHC II β comprende un dominio extracelular de un MHC II β humano, y dominios transmembrana y citoplásmicos del polipéptido MHC II β endógeno de ratón. Los roedores modificados genéticamente, por ejemplo, ratones, que comprenden la secuencia o secuencias de nucleótido que codifican el MHC II quimérico humano/roedor, por ejemplo, humano/ratón, se describen con más detalle en las Solicitudes de Patente de EE.UU. N.º 13/661.116 y 13/793.935. En una realización, el animal que expresa las proteínas CD4 y/o MHC II humanizadas se genera a través de la sustitución de porciones de los genes CD4 y/o MHC II de roedores endógenos, por ejemplo, de ratón, en los loci CD4 y/o MHC II, respectivamente.

Por lo tanto, también se proporciona un método para modificar un locus CD4 de un roedor, por ejemplo, un ratón, para expresar un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico que comprende reemplazar en un locus CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 endógeno de roedor, por ejemplo, ratón, con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico. En una realización, el polipéptido CD4 quimérico humano/roedor, por ejemplo, humano/ratón, comprende al menos todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3 de un polipéptido CD4 humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD4 endógeno de roedor, por ejemplo, ratón. En una realización, el CD4 humano/ratón quimérico expresado se expone en la SEQ ID NO: 4.

En otra realización, el co-receptor de células T es CD8. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un roedor modificado genéticamente que comprende una secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido CD8 α y/CD8 β quimérico humano/roedor. La secuencia de nucleótidos está presente en un locus CD8

endógeno. En una realización, el animal es un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata. Por lo tanto, en una realización, se proporciona un ratón modificado genéticamente que comprende en su locus endógeno CD8 α y CD8 β) una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 α humano/ratón quimérico y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 β humano/ratón quimérico, en donde la primera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un polipéptido CD8 α humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD8 α de ratón, y en donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un polipéptido CD8 β humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD8 β de ratón, en donde el ratón expresa una proteína CD8 humana/ratón quimérica funcional. El ratón no expresa un polipéptido CD8 endógeno funcional a partir de su locus CD8 de ratón endógeno. En una realización, la primera secuencia de nucleótidos está unida operativamente al promotor CD8 α de ratón endógeno y las secuencias reguladoras, y la segunda secuencia de nucleótidos está unida operativamente al promotor CD8 β de ratón endógeno y a las secuencias reguladoras. Por lo tanto, en una realización, el ratón no expresa la proteína CD8 quimérica en células B o células T de linaje CD4. En una realización, la porción humana del polipéptido CD8 α y/o β quimérico comprende un dominio similar a la inmunoglobulina V del CD8 α humano y/o el polipéptido β . En una realización, una porción humana del polipéptido CD8 α humano/ratón quimérico comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 59. En una realización, una porción humana del polipéptido CD8 β humano/ratón quimérico comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 58. En una realización, el polipéptido CD8 α humano/ratón quimérico se expone en la SEQ ID NO: 54, y el polipéptido CD8 β humano/ratón quimérico se expone en la SEQ ID NO: 53.

El roedor modificado genéticamente, por ejemplo, el ratón genéticamente modificado, que comprende los polipéptidos CD8 α y/ β quiméricos descritos en el presente documento comprende además una proteína MHC I humanizada, en donde la proteína MHC I comprende un dominio extracelular de un polipéptido MHC I humano. Por lo tanto, el roedor puede comprender una proteína MHC I humanizada y un polipéptido de microglobulina β 2 humana o humanizada. En una realización, el roedor es un ratón y el ratón comprende en el locus del MHC I endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del MHC I humano/ratón quimérico, en donde una porción humana del polipéptido MHC I comprende un dominio extracelular de un polipéptido MHC I humano, y dominios transmembrana y citoplásmicos del polipéptido MHC I de ratón endógeno; en donde el ratón también comprende en un locus de β 2 microglobulina endógena una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de β 2 microglobulina humano o humanizado. Los roedores modificados genéticamente, por ejemplo, ratones, que comprenden una secuencia o secuencias de nucleótido que codifican MHC I y β 2 microglobulina quiméricos humano/roedor, por ejemplo, humano/ratón, se describen con más detalle en las Solicitudes de Patente de EE.UU. N.º 13/661.159 y 13/793.812. En una realización, el roedor que expresa la proteína o proteínas CD8, MHC I, y/o β 2 microglobulina humanizadas se genera a través de la sustitución de porciones de genes de CD8, MHC I y/o microglobulina β 2 endógenos no humanos, por ejemplo, de ratón, en los loci CD8, MHC I y/o microglobulina β 2, respectivamente.

Por lo tanto, también se proporciona un método para modificar un locus CD8 de un ratón para expresar un polipéptido CD8 humano/ratón quimérico que comprende reemplazar en un locus CD8 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 de ratón endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 humano/ratón quimérico. El polipéptido CD8 es una combinación de CD8 α y CD8 β . En una realización, el polipéptido quimérico CD8 (CD8 α y CD8 β) humano/ratón; comprende todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un polipéptido CD8 humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD8 de ratón endógeno.

Se divulgan también en el presente documento células, por ejemplo, células T, derivadas de los roedores (por ejemplo, ratones o ratas) descritos en el presente documento. Se divulgan también tejidos y embriones derivados de animales no humanos descritos en el presente documento.

Cualquiera de las realizaciones y aspectos descritos en el presente documento pueden usarse juntos entre sí, salvo que se indique otra cosa o sea evidente a partir del contexto. Otras realizaciones serán evidentes para un experto en la materia a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada. La siguiente descripción detallada incluye representaciones a modo de ejemplo de las diversas realizaciones de la invención, que no son restrictivas de la invención como se reivindica. Las figuras acompañantes constituyen una porción de la presente memoria descriptiva y, junto con la descripción, sirven únicamente para ilustrar las realizaciones y no limitar la invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática (no a escala) de la estrategia para generar un locus CD4 humanizado. La secuencia de los exones 3-6 del ratón, empezando justo después del péptido señal, se reemplazó primero con la secuencia del exón 3 humano en dirección 3 del péptido señal (parte superior) y, posteriormente, los exones 4-6 humanos se insertaron en dirección del exón 3 humano mediante la digestión/ligación de restricción.

La Figura 2 muestra el análisis FACS con anticuerpos anti-CD4 humanos y anti-CD4 de ratón de esplenocitos derivados de ratón TS o heterocigoto de ratón para CD4 humano (1766HET) (**A**); y análisis FACS de células T

derivadas de ratón TS frente a ratón 1766HET frente a línea de células T CD4 humanas Jurkat.

La Figura 3 es una representación esquemática (no a escala) de la estrategia para generar un locus CD8b humanizado (MAID 1737) mediante la sustitución de exones 2-3 de CD8 β de ratón por exones 2-3 de CD8 β humanos. Las secuencias de exones del ratón están representadas por rectángulos rellenos, las secuencias de exones humanos están representadas por rectángulos sombreados.

La Figura 4 es una representación esquemática (no a escala) de la estrategia para generar un locus CD8a humanizado (MAID 1738) mediante el reemplazo de una porción del exón 1 y el exón 2 del ratón con exones humanos 2-3, reteniendo la secuencia líder del ratón al comienzo del exón 1. Las secuencias de exones del ratón están representadas por rectángulos rellenos, las secuencias de exones humanos están representadas por rectángulos sombreados.

La Figura 5 es una representación esquemática (no a escala) de la estrategia de direccionamiento secuencial para generar loci humanizados que comprenden la secuencia que codifica los genes CD8b y CD8a humanizados. Las secuencias de exones del ratón están representadas por rectángulos rellenos, las secuencias de exones humanos están representadas por rectángulos sombreados.

La Figura 6 es un análisis FACS con cualquiera de los anticuerpos CD8b de ratón, CD8a de ratón, CD8b humano, o CD8a humano de los esplenocitos de ratón TS o heterocigoto de ratón tanto para CD8b como para CD8a humanos, con casetes de selección retirados (1739 Het, 1740 Het).

La Figura 7 es un análisis FACS con cualquiera de CD8b de ratón, CD8a de ratón, CD8b humano, CD8a humano o CD4 de timocitos obtenidos con ratones TS o 1739HET/1740HET (ratones heterocigotos para CD8b y CD8a).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

La presente invención se refiere a roedores genéticamente modificados (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, etc.) que expresan polipéptidos de co-receptor de células T humanizadas; embriones, células y tejidos que comprenden los mismos; métodos para producir los mismos; así como métodos de uso de los mismos. Salvo que se defina de otro modo, todos los términos y frases usados en el presente documento incluyen los significados que los términos y las frases han adquirido en la técnica, salvo que se indique claramente lo contrario o sea claramente evidente a partir del contexto en el que se usa el término o frase.

El término "conservativa", cuando se usa para describir una sustitución conservativa de aminoácido, incluye la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido que tiene un grupo R de la cadena secundaria con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). Pueden conseguirse sustituciones conservativas de aminoácidos modificando una secuencia de nucleótidos con el fin de introducir un cambio de nucleótidos que codificará la sustitución conservativa. En general, una sustitución conservativa de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de CD4 o CD8 para unirse a MHC II o MHC I, respectivamente, y aumentar la sensibilidad del TCR al antígeno presentado por MHC. 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 hidroxil alifáticas 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 sustitución de aminoácidos conservativa incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/arginina, lisina/arginina, alanina/valina, glutamato/aspartato y asparagina/glutamina. En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácidos conservativa puede ser una sustitución de cualquier resto nativo en una proteína con alanina, como se usa en, por ejemplo, la mutagénesis por barrido de alanina. En algunas realizaciones, se realiza una sustitución conservativa que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad de registro PAM250 descrita en Gonnet et al. ((1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45). En algunas realizaciones, la sustitución es una sustitución moderadamente conservativa en donde la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

Por lo tanto, La invención también abarca un roedor modificado genéticamente cuyo genoma comprende (por ejemplo, en un locus endógeno) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de co-receptor de células T humanizado (por ejemplo, polipéptido CD4 o CD8), en donde el polipéptido comprende sustituciones conservativas de aminoácidos de la secuencia o secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento.

Un experto en la materia entenderá que en la adición a los restos de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos del co-receptor de células T humanizados descritos en el presente documento, debido a la degeneración del código genético, otros ácidos nucleicos pueden codificar los polipéptidos desvelados. Por tanto, además de un roedor modificado genéticamente que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido del co-receptor de células T (por ejemplo, el polipéptido CD4 o CD8) con sustituciones de aminoácidos conservativas, también se proporciona un roedor cuyo genoma comprende una secuencia de nucleótidos que difiere de la descrita en el presente documento debido a la degeneración del código genético.

El término "identidad", cuando se usa junto con secuencia incluye identidad como se determina mediante numerosos algoritmos diferentes conocidos en la técnica que se pueden usar para medir la identidad de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, las identidades se determinan usando una alineación ClustalW v. 1.83 (lenta) empleando una penalización de hueco abierto de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,1 y usando una matriz de similitud de Gonnet (MacVector™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008). La longitud de las secuencias comparadas con respecto a la identidad de las secuencias dependerá de las secuencias concretas. En diversas realizaciones, la identidad se determina comparando la secuencia de una proteína madura desde su N terminal a su C terminal. En diversas realizaciones cuando se compara una secuencia humana/roedor quimérica con una secuencia humana, la porción humana de la secuencia humana/roedor quimérica (pero no la porción de roedor) se usa en la preparación de una comparación con el fin de discernir un nivel de identidad entre una secuencia humana y una porción humana de una secuencia humana/de roedor quimérica (por ejemplo, comparando un ectodominio humano de una proteína humana/de ratón quimérica con un ectodominio humano de una proteína humana).

Los términos "homología" u "homólogo" en referencia a las secuencias, por ejemplo, nucleótidos o secuencias de aminoácidos, significan dos secuencias que, tras el alineamiento y la comparación óptimos, son idénticos en, por ejemplo, al menos aproximadamente el 75 % de nucleótidos o aminoácidos, por ejemplo, al menos aproximadamente el 80 % de nucleótidos o aminoácidos, por ejemplo, al menos aproximadamente el 90-95 % de nucleótidos o aminoácidos, por ejemplo, más del 97 % de nucleótidos o aminoácidos. Un experto en la materia entenderá que, para el direccionamiento óptimo del gen, la construcción directora debe contener brazos homólogos a secuencias de ADN endógenas (es decir, "brazos de homología"); de esta manera, se puede producir la recombinación homóloga entre la construcción de direccionamiento y la secuencia endógena dirigida.

La frase "unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos de esta manera están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Así pues, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína puede unirse operativamente a secuencias reguladoras (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencia silenciadora, etc.) con el fin de retener la regulación de la transcripción adecuada. Además, diversas porciones de una proteína quimérica o humanizada pueden unirse operativamente para retener el plegamiento, el procesamiento, la dirección, la expresión adecuados y otras propiedades funcionales de la proteína en la célula. A menos que se indique otra cosa, diversos dominios de las proteínas quimérica o humanizada se unen operativamente entre sí.

El término "reemplazo", en referencia al reemplazo génico se refiere a colocar material genético exógeno en un locus genético endógeno, reemplazando de esta manera la totalidad o una porción del gen endógeno con una secuencia de ácido nucleico ortóloga u homóloga. Como se demuestra en los Ejemplos siguientes, las secuencias de ácido nucleico de loci endógenos que codifican porciones de CD4 o CD8 (CD8 α y/o CD8 β) de ratón fueron reemplazadas por secuencias de nucleótidos que codifican porciones de polipéptidos CD4 o CD8 (CD8 α y/o CD8 β) humanos, respectivamente.

"Funcional" como se usa en el presente documento, por ejemplo, en referencia a un polipéptido funcional, se refiere a un polipéptido que retiene al menos una actividad biológica normalmente asociada a la proteína nativa. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, un reemplazo en un locus endógeno (por ejemplo, un reemplazo en un locus CD4 o CD8 de roedor endógeno) da como resultado un locus que no expresa un polipéptido endógeno funcional.

Varios aspectos descritos a continuación para los roedores CD4 modificados genéticamente, por ejemplo, tipo de animal; cepas de animales; tipos celulares; selección, detección y otros métodos; métodos de uso; etc., será aplicable a los animales CD8 genéticamente modificados.

Animales CD4 modificados genéticamente

En diversas realizaciones, la invención generalmente proporciona roedores modificados genéticamente que comprenden en su genoma, en un locus CD4 endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humanizado; de esta manera, los animales expresan un polipéptido CD4 humanizado.

El gen CD4 humano se localiza en el cromosoma 12 y se cree que contiene 10 exones. El gen CD4 codifica una proteína con secuencia de señal hidrofóbica amino-terminal, codificada por los exones 2 y 3 del gen. La proteína comprende 4 dominios de tipo inmunoglobulina, conocidos comúnmente como dominios D1-D4. Maddon et al. (1987) Structure and expression of the human and mouse T4 genes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:9155-59. Se cree que el dominio D1 está codificado por el exón 3 (secuencia en dirección 3' del péptido señal) y el exón 4, mientras que D2, D3 y D4 están codificados por un exón separado cada uno - los exones 5, 6 y 7, respectivamente. Littman (1987) The Structure of the CD4 and CD8 Genes, Ann. Rev. Immunol. 5:561-84; Hanna et al. (1994) Specific Expression of the Human CD4 Gene in Mature CD4+CD8- and Immature CD4+CD8+ T cells and in Macrophages of Transgenic Mice, Mol. Cell. Biol. 14(2):1084-94; Maddon et al., *supra*. En áreas de alta concentración de proteínas, tales como el área de contacto entre la célula T y la célula presentadora de antígeno, la molécula tiende a

homodimerizarse a través de interacciones entre dominios D4 opuestos. Zamoyska (1998) CD4 and CD8: modulators of T cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr. Opin. Immunol.* 10:82-87; Wu et al. (1997) Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4, *Nature* 387:527; Moldovan et al. (2002) CD4 Dimers Constitute the Functional Component Required for T Cell Activation, *J. Immunol.* 169:6261-68.

5 El dominio D1 de CD4 se parece al dominio variable (V) de inmunoglobulina y, junto con una porción del dominio D2, se cree que se une a MHC II. Huang et al. (1997) Analysis of the contact sites on the CD4 Molecule with Class II MHC Molecule, *J. Immunol.* 158:216-25. A su vez, El MHC II interactúa con el co-receptor de células T CD4 en la grieta hidrófoba en el punto de unión entre los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ del MHC II. Wang and Reinherz (2002) Structural Basis of T Cell Recognition of Peptides Bound to MHC Molecules, *Molecular Immunology*, 38:1039-49.

15 Se cree que los dominios D3 y D4 del co-receptor de CD4 interactúan con el complejo TCR-CD3, ya que la sustitución de estos dos dominios anuló la capacidad de CD4 para unirse al TCR. Vignali et al. (1996) The Two Membrane Proximal Domains of CD4 Interact with the T Cell Receptor, *J. Exp. Med.* 183:2097-2107. La molécula CD4 existe como un dímero, y se cree que los restos en el dominio D4 de la molécula son responsables de la dimerización de CD4. Moldovan et al. (2002) CD4 Dimers Constitute the Functional Components Required for T Cell Activation, *J. Immunol.* 169:6261-68.

20 El exón 8 del gen CD4 codifica el dominio transmembrana, mientras que el resto del gen codifica el dominio citoplásmico. El dominio citoplásmico CD4 posee muchas funciones distintas. Por ejemplo, el dominio citoplásmico de CD4 recluta una tirosina quinasa Lck. Lck es una quinasa de la familia Src que está asociada a los dominios citoplásmicos CD4 y CD8 y la unión simultánea de los co-receptores y TCR al mismo MHC da lugar a un aumento de la fosforilación de tirosina de las cadenas CD3 y of del complejo TCR, lo que a su vez conduce al reclutamiento de otros factores que juegan un papel en la activación de las células T. Itano y colaboradores han propuesto que la cola citoplásmica de CD4 también promueve la diferenciación de las células T CD4+CD8+ en el linaje CD4+ mediante el diseño y prueba de la expresión de la proteína híbrida que comprende el dominio extracelular CD8 y la cola citoplásmica CD4 en ratones transgénicos. Itano et al. (1996) The Cytoplasmic Domain of CD4 Promotes the Development of CD4 Lineage T Cells, *J. Exp. Med.* 183:731-41. La expresión de la proteína híbrida condujo al desarrollo de células T específicas de MHC I de linaje CD4. *Id.* El co-receptor CD4 parece ser el principal receptor del virus del VIH, siendo el agotamiento de las células T CD4+ un indicador del avance de la enfermedad. La cola citoplásmica de CD4 parece ser esencial para transmitir la señal apoptótica a las células T CD4+ en la apoptosis inducida por el VIH. Específicamente, la interacción de CD4 y Lck demostró potenciar la apoptosis inducida por el VIH en estas células. Corbeil et al. (1996) HIV-induced Apoptosis Requires the CD4 Receptor Cytoplasmic Tail and Is Accelerated by Interaction of CD4 with p56lck, *J. Exp. Med.* 183:39-48.

35 Las células T se desarrollan en el timo progresando desde timocitos inmaduros CD4-/CD8- (doble negativo o DN) a timocitos CD4+/CD8+ (doble positivo o DP), que finalmente experimentan una selección positiva para convertirse en células T CD4+ o CD8+ (solo positivo o SP). Los timocitos DP que reciben señales a través del TCR restringido por MHC I se diferencian en células T CD8+, mientras que los timocitos DP que reciben señales a través de TCR restringido por MHC II se diferencian en células T CD4+. Las señales recibidas por la célula DP que conducen a su diferenciación en CD4+ de células T CD8+ han sido objeto de numerosas investigaciones. Se han propuesto diversos modelos para la elección del linaje CD4/CD8 y se revisan en Singer et al. (2008) Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8- lineage choice, *Nat. Rev. Immunol.* 8:788-801.

45 La desactivación de un co-receptor de células T específico como resultado de una selección positiva es un producto de la regulación transcripcional. Para CD4, se ha demostrado que un potenciador ubicado 13 kb en sentido ascendente del exón 1 de CD4 regula la expresión de CD4 en células T CD4+ y CD8+. Killeen et al. (1993) Regulated expression of human CD4 rescues helper T cell development in mice lacking expression of endogenous CD4, *EMBO J.* 12:1547-53. Un silenciador transcripcional que actúa en *cis* situado dentro del primer intrón del gen CD4 murino funciona para silenciar la expresión de CD4 en células distintas de las células T CD4+. Siu et al. (1994) A transcriptional silencer control the developmental expression of the CD4 gene, *EMBO J.* 13:3570-3579.

55 Debido a los importantes reguladores de la transcripción (por ejemplo, promotores, potenciadores, silenciadores, etc.) que controlan la elección del linaje CD4 faltaban en varias cepas de ratones transgénicos desarrollados previamente que expresan CD4 humano, estos ratones no pudieron recapitular el desarrollo del linaje de células T normales y produjeron células inmunes distintas de las células T CD4+ que expresaban CD4. Véase, por ejemplo, Law et al. (1994) Human CD4 Restores Normal T Cell Development and Function in Mice Deficient in CD4, *J. Exp. Med.* 179:1233-42 (expresión de CD4 en células T CD8+ y células B); Fugger et al. (1994) Expression of HLA-DR4 and human CD4 transgenes in mice determines the variable region β -chain T-cell repertoire and mediates an HLA-D-restricted immune response, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 91:6151-55 (CD4 expresado en todos los timocitos CD3+ y células B). Por lo tanto, en una realización, puede haber un beneficio en el desarrollo de un animal modificado genéticamente que retenga el promotor endógeno del ratón y otros elementos reguladores para que el animal produzca células T que sean capaces de experimentar el desarrollo normal de las células T y la elección del linaje.

65 Por lo tanto, en diversas realizaciones, la invención proporciona un roedor genéticamente modificado que comprende, en su locus endógeno de co-receptor de células T (por ejemplo, locus de CD4), una secuencia de

nucleótidos que codifica un polipéptido correceptor de células T humano/roedor quimérico. La porción humana del polipéptido quimérico comprende todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un co-receptor de células T humanas. La porción de roedor del polipéptido quimérico comprende dominios transmembrana y citoplásmicos de un co-receptor de células T de roedor. El roedor expresa un polipéptido de co-receptor de células T quimérico funcional.

5 Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un roedor modificado genéticamente que comprende en su locus CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/roedor quimérico, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un CD4 humano, en donde una porción de roedor comprende al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un CD4 de roedor, y en donde el animal expresa un polipéptido de CD4 quimérico funcional. El
10 roedor solo expresa el polipéptido CD4 humanizado, es decir, el polipéptido de CD4 humano/roedor quimérico, y no expresa una proteína CD4 de roedor endógeno funcional desde su locus CD4 endógeno.

En una realización, la porción humana del polipéptido CD4 humano/roedor quimérico comprende todo o
15 sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido CD4 humano. El polipéptido CD4 humano/roedor quimérico comprende al menos todo o sustancialmente todo el dominio de unión a MHC II (por ejemplo, una porción sustancial de los dominios D1 y D2) del polipéptido CD4 humano; en una realización, la porción humana del polipéptido CD4 humano/roedor quimérico comprende todo o sustancialmente todo de los dominios D1, D2 y D3 del polipéptido CD4 humano; en otra realización más, la porción humana del polipéptido CD4 humano/roedor quimérico comprende todos o sustancialmente todos los dominios de inmunoglobulina de CD4, por ejemplo, los dominios
20 denominados D1, D2, D3 y D4. La porción humana del polipéptido CD4 humano/roedor quimérico comprende en su porción humana toda o sustancialmente toda la secuencia de CD4 humana que es responsable de interactuar con el MHC II y/o la porción extracelular de un receptor de células T. La porción humana del polipéptido CD4 humano/roedor quimérico comprende toda o sustancialmente toda la porción extracelular de la CD4 humana que es responsable de interactuar con el MHC II y/o el dominio variable de un receptor de células T. La secuencia de
25 nucleótidos que codifica la porción humana del polipéptido CD4 quimérico comprende toda o sustancialmente toda la secuencia codificante de los dominios D1-D2 de CD4 humana (por ejemplo, una porción del exón 3 y los exones 4-5 del gen de CD4 humano); en otra realización, comprende toda o sustancialmente toda la secuencia de codificación de D1-D3 del CD4 humano (por ejemplo, porción del exón 3 y los exones 4-6 del CD4 humano). Por lo tanto, en una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el CD4 humano/roedor quimérico comprende secuencias de
30 nucleótidos que codifican todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3 del CD4 humano. En otra realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la porción humana del polipéptido CD4 quimérico comprende la secuencia codificante de los dominios D1-D4 del gen CD4 humano. En otra realización, la secuencia de nucleótidos puede comprender la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal CD4 del ratón, por ejemplo, la región codificada por porciones de exones 2-3 del gen de ratón. En otra realización, la secuencia de nucleótidos puede
35 comprender la secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal CD4 humano. En una realización, el polipéptido CD4 humano/roedor quimérico comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 y la porción humana del polipéptido quimérico se extiende aproximadamente en los aminoácidos 27-319 de la SEQ ID NO: 4 (expuesta por separado en la SEQ ID NO: 57).

40 El roedor expresa una secuencia de polipéptido CD4 humano/no humano quimérico. En una realización, una porción humana de la secuencia de CD4 quimérica comprende una o más modificaciones conservativas o no conservativas.

En un aspecto, se proporciona un roedor que expresa una secuencia de CD4 humana, en donde la secuencia de CD4 humana es al menos aproximadamente el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99% idéntica a
45 una secuencia de CD4 humana. En una realización específica, la secuencia de CD4 humana es al menos aproximadamente el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99% idéntica a la secuencia de CD4 humana descrita en los Ejemplos. En una realización, la secuencia de CD4 humana comprende una o más sustituciones conservativas. En una realización, la secuencia de CD4 humana comprende una o más sustituciones no
50 conservativas.

En algunas realizaciones, una porción, por ejemplo, una porción humana del CD4 quimérico, puede comprender sustancialmente toda la secuencia indicada en el presente documento (por ejemplo, sustancialmente todo un dominio de proteína indicado en el presente documento). Sustancialmente toda la secuencia generalmente incluye el
55 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de los aminoácidos que se cree representan una porción particular de la proteína (por ejemplo, un dominio funcional particular, etc.). Un experto en la materia entendería que los límites de un dominio funcional pueden variar ligeramente dependiendo de la alineación y los métodos de predicción de dominio usados.

La porción de roedor del polipéptido CD4 humano/roedor quimérico comprende al menos dominios transmembrana y
60 citoplásmicos del polipéptido CD4 de roedor. Debido a las funciones importantes servidas por el dominio citoplásmico CD4, la retención de la secuencia de roedor endógena (por ejemplo, ratón) en animales genéticamente diseñados asegura la preservación de la señalización intracelular adecuada y otras funciones del co-receptor. En una realización, el roedor es un ratón y el polipéptido CD4 de roedor es un polipéptido CD4 de ratón. Aunque en los ejemplos se describe una secuencia de CD4 de ratón específica, cualquier secuencia adecuada derivada de la
65 misma, por ejemplo, secuencia que comprende sustituciones de aminoácidos conservativas/no conservativas, se abarca en el presente documento. En una realización, la porción de roedor del co-receptor de CD4 quimérico

comprende cualquier secuencia del CD4 endógeno que no se ha humanizado.

El roedor descrito en el presente documento puede comprender en su locus endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/roedor quimérico. En un aspecto, esto da como resultado un reemplazo de una porción de un gen CD4 endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica una porción de un polipéptido CD4 humano. En una realización, dicha sustitución es una sustitución de la secuencia de nucleótidos endógena que codifica, por ejemplo, todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de un CD4 no humano, por ejemplo, una secuencia que codifica al menos todo o sustancialmente todo el primer dominio de tipo inmunoglobulina (es decir, D1) de un CD4 de roedor (por ejemplo, una secuencia que codifica todos o sustancialmente todos los dominios D1-D2 de un CD4 de roedor, por ejemplo, una secuencia que codifica todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3 de un CD4 de roedor, por ejemplo, una secuencia que codifica todos o sustancialmente todos los dominios D1-D4 de un CD4 de roedor), con una secuencia de nucleótidos humana que codifica el mismo. El reemplazo da como resultado una proteína quimérica que comprende la secuencia de CD4 humana que es responsable de la interacción con el MHC II y/o la porción extracelular de un receptor de células T. En otra realización más, el reemplazo da como resultado una proteína quimérica que comprende la secuencia de CD4 humana que es responsable de la interacción con el MHC II y/o el dominio variable de un receptor de células T. El reemplazo no comprende un reemplazo de una secuencia de CD4 que codifica al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido de CD4 de roedor. Por lo tanto, el roedor expresa un polipéptido CD4 humano/roedor quimérico del locus CD4 de roedor endógeno. En otra realización más, el reemplazo da como resultado una proteína que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 4.

Se proporciona la secuencia de nucleótidos del locus CD4 humano/roedor quimérico (por ejemplo, locus CD4 humano/ratón quimérico) descrito en el presente documento. En un aspecto, debido a que la secuencia de CD4 humano/roedor quimérica, por ejemplo, humano/ratón, se coloca en el locus CD4 del roedor endógeno (por ejemplo, ratón), retiene el elemento potenciador de CD4 ubicado en dirección 5' del primer exón de CD4. En una realización, el reemplazo en el locus CD4 de roedor endógeno (por ejemplo, ratón) comprende un reemplazo de, por ejemplo, una porción del exón 3 que codifica D1 y los exones 4-6 que codifican el resto de D1 y D2-D3 del polipéptido CD4; de esta manera, en un aspecto, el locus CD4 quimérico retiene el silenciador que actúa en *cis* situado en el intrón 1 del gen CD4 de roedor (por ejemplo, ratón). Por lo tanto, en una realización, el locus quimérico retiene el promotor CD4 de roedor endógeno (por ejemplo, de ratón) y los elementos reguladores. En otra realización, el locus quimérico puede contener elementos promotores y reguladores humanos en la medida en que permitan la expresión adecuada de CD4, el desarrollo de células T CD4+, la elección de linaje CD4 y la función de co-receptor. Por lo tanto, en algunos aspectos, los roedores de la invención comprenden una modificación genética que no altera la elección adecuada del linaje y el desarrollo de células T. En un aspecto, los roedores (por ejemplo, ratones) de la invención no expresan el polipéptido CD4 quimérico en células inmunes distintas de las células que normalmente expresan CD4. En un aspecto, los roedores no expresan CD4 en células B o células T CD8+ SP. En una realización, el reemplazo da como resultado la retención de elementos que permiten una regulación espacial y temporal adecuada de la expresión de CD4.

En una realización, el roedor se selecciona de un ratón, una rata y un hámster. En una realización, el roedor se selecciona de la superfamilia Muroidea. En una realización, el animal genéticamente modificado es de una familia seleccionada de Calomyscidae (por ejemplo, hámsteres similares a ratones), Cricetidae (por ejemplo, hámster, ratas y ratones del nuevo mundo, campañoles), Muridae (ratones y ratas auténticos, jerbos, ratones espinosos, ratas con cresta), Nesomyidae (ratones trepadores, ratones de abazón de las rocas, ratas coliblancas, ratas y ratones de Madagascar), Platacanthomyidae (por ejemplo, lirón espinoso), y Spalacidae (por ejemplo, ratas topo, ratas del bambú, y zokores). En una realización específica, el roedor genéticamente modificado se selecciona de un ratón o rata auténticos (familia Muridae), un jerbo, un ratón espinoso y una rata con cresta. En una realización, el ratón genéticamente modificado es un miembro de la familia Muridae. En una realización específica, el roedor se selecciona de un ratón y una rata. En una realización, el roedor es un ratón.

En una realización específica, el roedor es un ratón de una cepa C57BL seleccionada de C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr y C57BL/Ola. En otra realización, el ratón es una cepa 129 seleccionada del grupo que consiste en una cepa que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (véase, por ejemplo, Festing *et al.* (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836, véase también, Auerbach *et al.* (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines). En una realización específica, el ratón modificado genéticamente es una mezcla de una cepa 129 anteriormente mencionada y una cepa C57BL/6 anteriormente mencionada. En otra realización específica, el ratón es una mezcla de las cepas 129 anteriormente mencionadas, o una mezcla de las cepas BL/6 anteriormente mencionadas. En una realización específica, la cepa 129 de la mezcla es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En otra realización, el ratón es una cepa BALB, por ejemplo, cepa BALB/c. En otra realización más, el ratón es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa anteriormente mencionada.

En una realización, el roedor es una rata. En una realización, la rata se selecciona de una rata Wistar, una cepa LEA, una cepa Sprague Dawley, una cepa Fischer, F344, F6 y Dark Agouti. En una realización, la cepa de la rata es

una mezcla de dos o más cepas seleccionadas del grupo que consiste en Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6 y Dark Agouti.

5 Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona un ratón modificado genéticamente que comprende en su genoma, por ejemplo, en su locus CD4 endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico, en donde una porción de ratón del polipéptido quimérico comprende al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido de CD4 de ratón, y en donde el ratón expresa un CD4 humano/ratón quimérico. En una realización, una porción humana del polipéptido quimérico comprende al menos todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido CD4 humano. Una porción humana del polipéptido quimérico comprende al menos todos o sustancialmente todos los dominios D1-D2 de una proteína CD4 humana, por ejemplo, al menos todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3 de una proteína CD4 humana, por ejemplo, todos o sustancialmente todos los dominios D1-D4 de una proteína CD4 humana. Por lo tanto, en una realización, el ratón comprende en el locus CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que comprende al menos todos o sustancialmente todos los exones 4, 5 y 6 del gen CD4 humano, por ejemplo, la secuencia del exón 3 del gen CD4 humano que codifica una parte del dominio D1 de CD4 humano y los exones 4-6 del gen CD4 humano. El ratón comprende en el locus CD4 endógeno un CD4 humano/ratón quimérico que comprende una secuencia de CD4 humana que es responsable de interactuar con el MHC II y/o la porción extracelular de un receptor de células T. El ratón comprende en el locus CD4 endógeno un CD4 humano/ratón quimérico que comprende una secuencia de CD4 humana que es responsable de interactuar con el MHC II y/o el dominio variable de un receptor de células T.

10 En una realización, la secuencia de nucleótidos comprende la secuencia que codifica el péptido señal de CD4 de ratón. En una realización, el ratón comprende una sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de CD4 de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de CD4 humano. En otra realización, el ratón comprende un reemplazo de la secuencia de nucleótidos que codifica al menos todo o sustancialmente todo el dominio CD4 D1 del ratón, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica al menos todos o sustancialmente todos los dominios D1-D2 de CD4 de ratón, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica al menos todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3 de CD4 de ratón, codificando la secuencia de nucleótidos humana el mismo. El ratón no expresa un CD4 endógeno funcional a partir de su locus CD4 de ratón endógeno. En una realización, el ratón descrito en el presente documento comprende la secuencia de nucleótidos CD4 humano/ratón quimérico en la línea germinal del ratón. En una realización, el ratón conserva cualquier secuencia endógena que no haya sido humanizada, por ejemplo, en la realización en donde el ratón comprende un reemplazo de la secuencia de nucleótidos que codifica todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3, el ratón conserva la secuencia de nucleótidos endógena que codifica el dominio CD4 D4 del ratón, así como una secuencia de nucleótidos que codifica los dominios transmembrana y citoplásmico de la CD4 del ratón.

20 En un aspecto, el ratón que expresa la proteína CD4 humana/ratón quimérica retiene el promotor CD4 del ratón y las secuencias reguladoras, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos en el ratón que codifica el CD4 humano/ratón quimérico está unida operativamente al promotor CD4 de ratón endógeno y a las secuencias reguladoras. En un aspecto, estas secuencias reguladoras de ratón retenidas en el animal manipulado genéticamente de la invención incluyen las secuencias que regulan la expresión de la proteína quimérica en etapas apropiadas durante el desarrollo de células T. Por lo tanto, en un aspecto, el ratón no expresa CD4 quimérico en células B o células T de linaje CD8. En un aspecto, el ratón tampoco expresa CD4 quimérico en ningún tipo de célula, por ejemplo, cualquier tipo de célula inmune, que normalmente no expresa CD4 endógeno.

45 En diversas realizaciones, un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata) que expresa una proteína CD4 quimérica funcional de un locus CD4 quimérico como se describe en el presente documento muestra la proteína quimérica en una superficie celular, por ejemplo, superficie de las células T. En una realización, el roedor expresa la proteína CD4 quimérica sobre una superficie celular en una distribución celular que es la misma que se observa en un humano. En un aspecto, la proteína CD4 descrita en el presente documento es capaz de interactuar con una proteína MHC II expresada en la superficie de una segunda célula, por ejemplo, una célula presentadora de antígeno (APC).

50 El roedor (por ejemplo, el ratón) de la invención comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína MHC II humana o humanizada, de manera que la proteína CD4 quimérica expresada en la superficie de una célula T del animal es capaz de interactuar con un MHC II humano o humanizado expresado en una superficie de una segunda célula, por ejemplo, una célula presentadora de antígeno. La proteína MHC II comprende un dominio extracelular de un polipéptido MHC II α humano y un dominio extracelular de un polipéptido MHC II β humano. Algunos animales modificados genéticamente a modo de ejemplo que expresan un polipéptido MHC II humano o humanizado se describen en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 13/661.116, presentada el 26 de octubre de 2012 y en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 13/793.935, presentada el 11 de marzo de 2013. El roedor que comprende la proteína CD4 quimérica descrita en el presente documento comprende además una proteína MHC II humanizada, en donde la proteína MHC II humanizada comprende: (1) un polipéptido MHC II α humanizado que comprende un dominio extracelular MHC II α humano y dominios transmembrana y citoplásmicos de un MHC II endógeno, por ejemplo, de ratón, en donde el dominio extracelular α de MHC II humano comprende los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de un MHC II α humano y (2) un polipéptido humanizado de MHC II β que comprende un dominio extracelular β de MHC II humano y dominios transmembrana y citoplásmico de un MHC II endógeno, por ejemplo, de ratón, en donde el dominio extracelular del MHC II β humano comprende los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ de un MHC II β humano. En un aspecto, ambos polipéptidos MHC II α y β humanizados están codificados por secuencias

de nucleótidos ubicadas en los loci α y β MHC II endógenos, respectivamente; el roedor no expresa polipéptidos α y β funcionales de MHC II. Por lo tanto, El MHC II expresado por los roedores puede ser una proteína MHC II quimérica humana/roedor (por ejemplo, humana/ratón). Una porción humana de la proteína MHC II quimérica puede derivar de una proteína HLA de clase II seleccionada del grupo que consiste en HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP, por ejemplo, HLA-DR4, HLA-DR2, HLA-DQ2.5, HLA-DQ8, o cualquier otra molécula HLA de clase II presente en una población humana. En la realización, en donde el roedor es un ratón, una porción de roedor (es decir, un ratón) del polipéptido MHC II quimérico puede derivar de una proteína MHC II de ratón seleccionada de H-2E y H-2A. En un aspecto, el roedor que comprende un CD4 humano/roedor quimérico y el MHC II humanizado descrito en las Solicitudes de Patente de EE.UU. N.º 13/661.116 y 13/793.935 pueden generarse criando un animal que comprende un locus CD4 quimérico como se describe en el presente documento con un animal que comprende un locus MHC II humanizado. El roedor también puede generarse introduciendo en células ES de un roedor que comprende el locus MHC II humanizado una secuencia de nucleótidos que codifica CD4 quimérico, por ejemplo, para el reemplazo en el locus CD4 endógeno; o la introducción en células ES de un roedor que comprende un locus CD4 quimérico una secuencia de nucleótidos que codifica MHC II humanizado.

En una realización, el roedor modificado genéticamente (por ejemplo, el ratón) que comprende tanto CD4 humano/roedor quimérico como MHC II humano o humanizado puede comprender una o dos copias de los genes que codifican estas proteínas; de esta manera, el roedor puede ser heterocigoto u homocigoto para los genes que codifican CD4 y MHC II quiméricos (es decir, MHC II α y/o MHC II β), respectivamente.

También se proporciona un método para fabricar un roedor diseñado genéticamente (por ejemplo, un ratón o una rata) descrito en el presente documento. En una realización, el método para fabricar un roedor modificado genéticamente da como resultado el roedor que comprende en un locus CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/roedor quimérico. En algunas realizaciones, el método utiliza una construcción directora preparada utilizando la tecnología VELOCIGENE®, introduciendo la construcción en las células ES, e introduciendo los clones de células ES dirigidas en un embrión de ratón utilizando la tecnología VELOCIMOUSE®, como se describe en los Ejemplos.

En una realización, la invención comprende un método para modificar un locus CD4 de un roedor para expresar un polipéptido CD4 humano/roedor quimérico descrito en el presente documento. En una realización, la invención proporciona un método para modificar un locus CD4 de un ratón para expresar un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico que comprende reemplazar en un locus CD4 endógeno de un ratón una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 de ratón endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido humano/ratón quimérico CD4. En un aspecto del método, el polipéptido CD4 humano/ratón quimérico comprende todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un polipéptido CD4 humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD4 de ratón endógeno. En otro aspecto del método, el polipéptido CD4 humano/ratón quimérico comprende todos o sustancialmente todos los dominios D1-D2 de un polipéptido CD4 humano. En otra realización más, el polipéptido CD4 humano/ratón quimérico comprende todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3 de un polipéptido CD4 humano. En otra realización más, el polipéptido CD4 humano/ratón quimérico comprende toda o sustancialmente toda la secuencia de aminoácidos de CD4 humano que es responsable de la interacción con MHC II y/o un dominio extracelular de un receptor de células T. En otra realización más, el polipéptido CD4 humano/ratón quimérico comprende toda o sustancialmente toda la secuencia de aminoácidos de CD4 humano que es responsable de la interacción con MHC II y/o un dominio variable de un receptor de células T.

Un casete de selección es una secuencia de nucleótidos insertada en una construcción directora para facilitar la selección de células (por ejemplo, células ES) que han integrado la construcción de interés. Un número de casetes de selección adecuados son conocidos en la técnica. De manera habitual, un casete de selección permite la selección positiva en presencia de un antibiótico concreto (por ejemplo, Neo, Hyg, Pur, CM, SPEC, etc.). Además, un casete de selección puede estar flanqueado por sitios de recombinación, que permiten la delección del casete de selección tras el tratamiento con enzimas recombinasa. Los sitios de recombinación comúnmente usados son /oxP y *Frt*, reconocidos por las enzimas Cre y Flp, respectivamente, pero se conocen otros en la técnica. Un casete de selección puede estar ubicado en cualquier lugar de la construcción fuera de la región de codificación. En una realización, el casete de selección está ubicado entre el exón 3 y el exón 4 de la secuencia de CD4 humana.

Tras completar el direccionamiento del gen, las células ES o el roedor modificado genéticamente se criban para confirmar la incorporación correcta de la secuencia de nucleótidos exógena de interés o la expresión del polipéptido exógeno. Los expertos en la materia conocen numerosas técnicas que incluyen (pero no se limitan a) transferencia Southern, PCR larga, PCR cuantitativa (por ejemplo, PCR en tiempo real usando TAQMAN®), hibridación *in situ* de fluorescencia, transferencia Northern, citometría de flujo, análisis Western, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, etc. En un ejemplo, los roedores (por ejemplo, ratones) que tienen la modificación genética de interés se pueden identificar al detectar la pérdida del alelo del ratón y/o la ganancia del alelo humano utilizando una modificación del ensayo del alelo descrito en Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659. Los expertos en la materia conocen otros ensayos que identifican una secuencia de nucleótidos o aminoácidos específica en los animales modificados genéticamente.

Diversas realizaciones descritas en el presente documento anteriormente en relación con roedores que expresan la proteína CD4 quimérica, así como las células y tejidos que la comprenden, puede ser aplicable a las realizaciones que describen roedores que expresan CD8 humano/roedor quimérico, descritos a continuación en el presente documento, o animales que expresan otros co-receptores de células T de roedor de roedor/humano quiméricos importantes.

Animales CD8 modificados genéticamente

En diversas realizaciones, la invención generalmente proporciona roedores modificados genéticamente que comprenden en su genoma, por ejemplo, en un locus CD8 endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 humanizado; de esta manera, los animales expresan un polipéptido CD8 humanizado. La invención proporciona roedores que comprenden en su genoma, en un locus CD8 endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 α humanizado y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 β humanizado. Por lo tanto, el roedor modificado genéticamente de la invención expresa un CD8 α humanizado y/o un polipéptido o polipéptidos CD8 β humanizados.

La proteína CD8 humana se expresa normalmente en la superficie celular como heterodímero de dos polipéptidos, CD8 α y CD8 β , aunque también se han detectado homodímeros y homomúltimeros unidos por enlaces disulfuro (por ejemplo, en células NK y células T $\gamma\delta$ intestinales, que expresan CD8 $\alpha\alpha$). Los genes que codifican CD8 α y CD8 β humanos están ubicados muy cerca uno del otro en el cromosoma 2. Nakayama et al. (1992) Recent Duplication of the Two Human CD8 β -chain genes, J. Immunol. 148:1919-27. La proteína CD8 α contiene un péptido líder, una región similar a la inmunoglobulina V, una región bisagra, un dominio transmembrana y una cola citoplásmica. Norment et al. (1989) Alternatively Spliced mRNA Encodes a Secreted Form of Human CD8 α . Characterization of the Human CD8 α gene, J. Immunol. 142:3312-19. Los exones/intrones del gen CD8 α se representan esquemáticamente en las Figuras 4 y 5.

El gen CD8 β humano se encuentra aguas arriba del gen CD8 α en el cromosoma 2. Se han informado múltiples isoformas generadas por el empalme alternativo del gen CD8 β , con una isoforma predicha que carece de un dominio transmembrana y genera una proteína secretada. Norment et al. (1988) A second subunit of CD8 is expressed in human T cells, EMBO J. 7:3433-39. Los exones/intrones del gen CD8 β se representan esquemáticamente en las Figuras 3 y 5.

La proteína CD8 β unida a la membrana contiene una secuencia señal N-terminal, seguida de un dominio tipo inmunoglobulina V, una región bisagra extracelular corta, un dominio transmembrana y una cola citoplásmica. Véase, Littman (1987) The structure of the CD4 and CD8 genes, Ann Rev. Immunol. 5:561-84. La región bisagra es un sitio de glicosilación extensa, que se cree que mantiene su conformación y protege la proteína de la escisión por las proteasas. Leahy (1995) A structural view of CD4 and CD8, FASEB J. 9:17-25.

La proteína CD8 se expresa comúnmente en las células T citotóxicas e interactúa con las moléculas MHC I. La interacción está mediada a través de la unión de CD8 al dominio α_3 del MHC I. Aunque la unión del MHC de clase I al CD8 es de aproximadamente 100 veces más débil que la unión del TCR al MHC de clase I, la unión de CD8 mejora la afinidad de la unión de TCR. Wooldridge et al. (2010) MHC Class I Molecules with Superenhanced CD8 Binding Properties Bypass the Requirement for Cognate TCR Recognition and Nonspecifically Activate CTLs, J. Immunol. 184:3357-3366.

La unión de CD8 a moléculas de MHC de clase I es específico de especie; el homólogo de ratón de CD8, Lyt-2, se mostró que une moléculas H-2D^d en el dominio α_3 , pero no unió moléculas HLA-A. Connolly et al. (1988) The Lyt-2 Molecule Recognizes Residues in the Class I α_3 Domain in Allogeneic Cytotoxic T Cell Responses, J. Exp. Med. 168:325-341. La unión diferencial se debió presumiblemente a determinantes similares a CDR (tipo CDR1 y CDR2) sobre CD8 que no se había conservado entre humanos y ratones. Sanders et al. (1991) Mutations in CD8 that Affect Interactions with HLA Class I and Monoclonal Anti-CD8 Antibodies, J. Exp. Med. 174:371-379; Vitiello et al. (1991) Analysis of the HLA-restricted Influenza-specific Cytotoxic T Lymphocyte Response in Transgenic Mice Carrying a Chimeric Human-Mouse Class I Major Histocompatibility Complex, J. Exp. Med. 173:1007-1015; y, Gao et al. (1997) Crystal structure of the complex between human CD8 $\alpha\alpha$ and HLA-A2, Nature 387:630-634. Se ha informado que el CD8 une HLA-A2 en una región conservada en el dominio α_3 (en la posición 223-229). Una única sustitución (V245A) en HLA-A redujo la unión de CD8 a HLA-A, con una reducción grande concomitante en la lisis mediada por linfocitos T. Salter et al. (1989), Polymorphism in the α_3 domain of HLA-A molecules affects binding to CD8, Nature 338:345-348. En general, el polimorfismo en el dominio α_3 de las moléculas HLA-A también afectó la unión a CD8. *Id.* En ratones, la sustitución de aminoácidos en el resto 227 en H-2D^d afectó a la unión de Lyt-2 de ratón a H-2D^d y las células transfectadas con un mutante H-2D^d no fueron lisadas por células T CD8+. Potter et al. (1989) Substitution at residue 227 of H-2 class I molecules abrogates recognition by CD8-dependent, but not CD8-independent, cytotoxic T lymphocytes, Nature 337:73-75. Por lo tanto, la expresión de CD8 humano o humanizado puede ser beneficiosa para estudiar las respuestas de las células T al antígeno presentado por el MHC I humano o humanizado.

Al igual que en CD4, el dominio citoplásmico de CD8 interactúa con la tirosina quinasa Lck, que a su vez da lugar a la activación de las células T. Aunque Lck parece interactuar con el dominio citoplásmico de CD8 α , parece que esta interacción está regulada por la presencia del dominio citoplásmico de CD8 β porque las mutaciones o la eliminación del dominio citoplásmico de CD8 β dieron como resultado una actividad de Lck asociada a CD8 α reducida. Irie et al. (1998) The cytoplasmic domain of CD8 β Regulates Lck Kinase Activation and CD8 T cell Development, J. Immunol. 161:183-91. La reducción en la actividad de Lck se asoció al deterioro en el desarrollo de células T. *Id.*

La expresión de CD8 en células apropiadas, por ejemplo, células T citotóxicas, está estrechamente regulada por diversos elementos potenciadores ubicados en todo el locus CD8. Por ejemplo, al menos 4 regiones de hipersensibilidad a ADNasa I, regiones a menudo asociadas con la unión del regulador, se han identificado en el locus CD8. Hosert et al. (1997) A CD8 genomic fragment that directs subset-specific expression of CD8 in transgenic mice, J. Immunol. 158:4270-81. Desde el descubrimiento de estas regiones hipersensibles a ADNasa I en el locus CD8, se han identificado al menos 5 elementos potenciadores, diseminada por el locus CD8, que regulan la expresión de CD8 α y/o β en células T de diversos linajes, incluyendo DP, células T CD8 SP o células que expresan $\gamma\delta$ TCR. Véase, por ejemplo, Kioussis et al. (2002) Chromatin and CD4, CD8A, and CD8B gene expression during thymic differentiation, Nature Rev. 2:909-919 y Online Erratum; Ellmeier et al. (1998) Multiple Development Stage-Specific Enhancers Regulate CD8 Expression in Developing Thymocytes and in Thymus-Independent T cells, Immunity 9:485-96.

Por lo tanto, de manera similar al beneficio derivado de retener el promotor de CD4 endógeno y los elementos reguladores para roedores modificados genéticamente de CD4 humanos o humanizados, en algunas realizaciones, puede haber un beneficio en el desarrollo de un roedor modificado genéticamente que retenga el promotor endógeno del ratón y elementos reguladores que controlarían la expresión de CD8 humano o humanizado. Puede haber un beneficio particular en la creación de animales modificados genéticamente que comprenden un reemplazo de secuencias de roedores endógenas que codifican proteínas CD8 α y/o β con aquellas que codifican proteínas CD8 α y/o β humanas o humanizadas, como se describe en el presente documento.

En diversas realizaciones, la invención proporciona un roedor modificado genéticamente que comprende en su genoma, en su locus CD8 endógeno, al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 α y β humano/roedor quimérico, en donde una porción humana del polipéptido comprende todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un CD8 α y/ β humano en donde una porción de roedor comprende al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un CD8 α y/ β de roedor y en donde el animal expresa el polipéptido CD8 α y β quimérico. Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona un roedor modificado genéticamente que comprende en su locus CD8 roedor endógeno una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 α humano/roedor quimérico y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 β humano/roedor quimérico, en donde la primera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido CD8 α humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD8 α de un roedor, y en donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido CD8 β humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD β de un roedor, en donde el animal expresa una proteína CD8 humana/roedor quimérica funcional. El roedor solo expresa un polipéptido CD8 humanizado (por ejemplo, el polipéptido CD8 α y/o β humano/roedor quimérico), y no expresa un polipéptido o polipéptidos CD8 funcional de roedor correspondiente del locus endógeno CD8.

En una realización, el polipéptido CD8 α humano/roedor quimérico comprende en su porción humana todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido CD8 α humano. La porción humana del polipéptido CD8 α quimérico comprende al menos el dominio de unión a MHC I del polipéptido CD8 α humano. En una realización, la porción humana del polipéptido CD8 α quimérico comprende la secuencia de al menos todo o sustancialmente todo el dominio tipo inmunoglobulina V del CD8 α humano. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la porción humana del polipéptido CD8 α quimérico comprende al menos los exones que codifican un dominio extracelular del polipéptido CD8 α humano. En una realización, la secuencia de nucleótidos comprende al menos los exones que codifican los dominios similares a Ig V. En una realización, el dominio extracelular de un polipéptido CD8 α humano es una región que abarca el dominio del polipéptido que no es un dominio transmembrana o citoplásmico. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido CD8 α humano/roedor quimérico comprende la secuencia que codifica un péptido señal de CD8 α de roedor, por ejemplo, ratón. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede comprender la secuencia que codifica una secuencia de señal CD8 α humana. En una realización, el polipéptido CD8 α humano/roedor quimérico comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 54, y la porción humana del polipéptido quimérico se expone en los aminoácidos 28-179 de la SEQ ID NO: 54 (representados por separado en la SEQ ID NO: 59).

De manera similar, en una realización, el polipéptido CD8 β humano/roedor quimérico comprende en su porción humana todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido CD8 β humano. En una realización, la porción humana del polipéptido CD8 β quimérico comprende la secuencia de todo o sustancialmente todo el dominio tipo inmunoglobulina V de CD8 β . En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la porción humana del polipéptido CD8 β quimérico comprende al menos los exones que codifican el dominio extracelular del polipéptido CD8 β humano. En una realización, la porción humana del polipéptido CD8 β humano/roedor quimérico comprende al

menos los exones que codifican el dominio tipo IgG V de CD8 β . En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido CD8 β humano/roedor quimérico comprende la secuencia que codifica un péptido señal de CD8 β de roedor, por ejemplo, ratón. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede comprender la secuencia que codifica una secuencia de señal CD8 β humana. En una realización, el polipéptido CD8 β humano/roedor quimérico comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 53, y la porción humana del polipéptido quimérico se expone en los aminoácidos 15-165 de la SEQ ID NO: 53 (representados por separado en la SEQ ID NO: 58).

El roedor expresa polipéptidos CD8 α y/o CD8 β humano/roedor quiméricos. En algunas realizaciones, la porción humana del polipéptido CD8 α y/o β humano/roedor quimérico comprende una o más modificación o modificaciones conservativas o no conservativas.

En un aspecto, se proporciona un roedor que expresa una secuencia de polipéptido CD8 α y/o β humano, en donde la secuencia del polipéptido CD8 α y/o β humano es al menos aproximadamente el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia de polipéptido CD8 α y/o β humana, respectivamente. En una realización específica, la secuencia del polipéptido CD8 α y/o β humano es al menos aproximadamente el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a la respectiva secuencia de polipéptido CD8 α y/o β humana descrita en los Ejemplos. En una realización, la secuencia del polipéptido CD8 α y/o β humano comprende una o más sustituciones conservativas. En una realización, la secuencia del polipéptido CD8 α y/o β humano comprende una o más sustituciones no conservativas.

En algunas realizaciones, una porción, por ejemplo, una porción humana del CD8 quimérico, puede comprender sustancialmente toda la secuencia indicada en el presente documento (por ejemplo, sustancialmente todo un dominio de proteína indicado en el presente documento). Sustancialmente toda la secuencia generalmente incluye el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de los aminoácidos que se cree representan una porción particular de la proteína (por ejemplo, un dominio funcional particular, etc.). Un experto en la materia entendería que los límites de un dominio funcional pueden variar ligeramente dependiendo de la alineación y los métodos de predicción de dominio usados.

La porción de roedor del polipéptido CD8 α y/o β humano/roedor quimérico comprende al menos el dominio transmembrana y/o citoplásmico del polipéptido CD8 α y/o β de roedor, respectivamente. Debido a las funciones importantes servidas por el dominio citoplásmico CD8, la retención de la secuencia de roedor endógena (por ejemplo, ratón) en animales genéticamente diseñados asegura la preservación de la señalización intracelular adecuada y otras funciones del co-receptor. En una realización, el roedor es un ratón, y el polipéptido CD8 α y/o β del roedor es un polipéptido CD8 α y/o β del ratón, respectivamente. Aunque las secuencias específicas de CD8 α y β de ratón se describen en los Ejemplos, cualquier secuencia adecuada derivada de la misma, por ejemplo, secuencia que comprende sustituciones de aminoácidos conservativas/no conservativas, se abarca en el presente documento. En una realización, el roedor, por ejemplo, el ratón, retiene cualquier secuencia endógena que no haya sido humanizada.

El roedor descrito en el presente documento comprende en su locus endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 α y/o β humano/roedor quimérico. En un aspecto, esto resulta en un reemplazo de una porción de un gen CD8 α endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica una porción de un polipéptido CD8 α humano, y/o un reemplazo de una porción de un gen CD8 β endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica una porción de un polipéptido CD8 β humano. En una realización, dicha sustitución es un reemplazo de la secuencia de nucleótidos endógena que codifica todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de un CD8 α y/o β de roedor con un nucleótido humano con una secuencia de nucleótidos humana que codifica la misma. En una realización, dicha sustitución es una sustitución de una secuencia que codifica al menos todo de sustancialmente todo el dominio similar a inmunoglobulina V de un CD8 α y/o β de roedor con una secuencia de nucleótidos humanos que codifica la misma. En una realización, el reemplazo no comprende un reemplazo de una secuencia CD8 α y/o β que codifica el dominio transmembrana y citoplásmico de un polipéptido CD8 α y/o β de roedor. Por lo tanto, el roedor expresa un polipéptido CD8 α y/o β humano/roedor quimérico del locus CD8 no humano endógeno. En otra realización más, el reemplazo resulta en una proteína CD8 α y/o β que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 54 y/o 53, respectivamente.

En un aspecto, debido a que la secuencia CD8 α y/o β de humano/roedor (por ejemplo, humano/ratón) quimérica se coloca en el locus CD8 α y/o β de roedor (por ejemplo, ratón) endógeno respectivo, retiene el promotor CD8 α y/o β endógeno y los elementos reguladores. En otra realización, el locus quimérico puede contener el promotor de CD8 α y/o β humano y elementos reguladores en la medida en que permitan la correcta expresión de CD8 α y/o β (expresión adecuada de proteínas espaciales y temporales), desarrollo de células T CD8+, la elección de linaje CD8 y la función de co-receptor. Por lo tanto, en un aspecto, los roedores de la invención comprenden una modificación genética que no altera la elección adecuada del linaje y el desarrollo de células T. En un aspecto, los roedores, de la invención no expresan la proteína CD8 quimérica en células inmunes distintas de las células que normalmente expresan CD8, por ejemplo, los roedores no expresan CD8 en células B o células T CD4+ SP. En una realización, el reemplazo da como resultado la retención de elementos que permiten una regulación espacial y temporal adecuada de la expresión de CD8 α y/o β .

Un roedor modificado genéticamente que comprende polipéptidos CD8 humanos o humanizados descritos en el presente documento puede seleccionarse de cualquier animal que se describió anteriormente en la sección relativa a animales CD4 humanizados. En una realización, el roedor puede ser por ejemplo, una rata o un ratón.

5 Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona un ratón modificado genéticamente que comprende en su genoma, en su locus CD8 endógeno, una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 α humano/ratón quimérico y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 β humano/ratón quimérico. En una realización, la primera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un polipéptido CD8 α humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido de CD8 α de ratón, y la segunda secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica todos o sustancialmente todos un dominio extracelular, un polipéptido CD8 β humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD8 β de ratón, y en donde el ratón expresa una proteína CD8 humana/ratón quimérica funcional. En una realización, la primera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica al menos el dominio tipo inmunoglobulina V del polipéptido CD8 α humano y las secuencias restantes de un polipéptido CD8 α de ratón, y la segunda secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica al menos el dominio de inmunoglobulina tipo V del polipéptido CD8 β humano y las secuencias restantes de un polipéptido CD8 β de ratón. La primera secuencia de nucleótidos comprende al menos el dominio de unión a MHC I de un polipéptido CD8 α humano. En una realización, la primera y la segunda secuencia de nucleótidos comprenden al menos los exones que codifican el dominio extracelular de un polipéptido CD8 α humano y/o polipéptido CD8 β , respectivamente. En una realización, el dominio extracelular de un polipéptido CD8 α humano y/o polipéptido CD8 β es una región que abarca el dominio del polipéptido CD8 α humano y/o polipéptido CD8 β que no es un dominio transmembrana o citoplásmico. En una realización, los dominios de un polipéptido CD8 α humano son como se representan esquemáticamente en las Figuras 4 y 5. En una realización, los dominios de un polipéptido CD8 β humano son como se representan esquemáticamente en las Figuras 3 y 5. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido CD8 α humano/ratón quimérico y/o el polipéptido CD8 β comprende la secuencia que codifica un péptido señal CD8 α y/o CD8 β de ratón, respectivamente. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede comprender la secuencia que codifica una secuencia señal CD8 α y/o CD8 β humana. En una realización, el ratón comprende un reemplazo de una secuencia de nucleótidos que codifica todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de CD8 α y/o CD8 β de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de CD8 α y/o CD8 β humano, respectivamente.

El ratón no expresa un polipéptido CD8 α y CD8 β endógeno funcional desde su locus CD8 endógeno. En una realización, el ratón, tal como se describe en la presente memoria, comprende la secuencia de CD8 quimérica/humana en su línea germinal.

En un aspecto, el ratón que expresa el polipéptido CD8 α y CD8 β humano/ratón quimérico retiene el promotor CD8 α y/o CD8 β de ratón y las secuencias reguladoras, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos en el ratón que codifica el CD8 humano/ratón quimérico está unida operativamente al promotor CD8 de ratón endógeno y a las secuencias reguladoras. En un aspecto, estas secuencias reguladoras retenidas en el ratón incluyen las secuencias que regulan la expresión de la proteína CD8 en las etapas apropiadas del desarrollo de las células T. En un aspecto, el ratón modificado genéticamente no expresa CD8 quimérico en células B o células T de linaje CD4, o cualquier célula, por ejemplo, célula inmunitaria, que normalmente no expresa CD8 endógeno.

45 En diversas realizaciones, un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata) que expresa una proteína CD8 $\alpha\beta$ quimérica funcional de un locus CD8 quimérico como se describe en el presente documento muestra la proteína quimérica en una superficie celular. En una realización, el roedor expresa la proteína CD8 quimérica sobre una superficie celular en una distribución celular que es la misma que se observa en un humano. En un aspecto, La proteína CD8 es capaz de interactuar con una proteína MHC I expresada en la superficie de una segunda célula.

50 El roedor (por ejemplo, el ratón) de la invención comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína MHC I humana o humanizada, de manera que la proteína CD8 quimérica expresada en la superficie de una célula T del animal es capaz de interactuar con un MHC I humano o humanizado expresado en una superficie de una segunda célula, por ejemplo, una célula presentadora de antígeno. La proteína MHC I comprende un dominio extracelular de un polipéptido MHC I humano. En una realización, el roedor comprende además un polipéptido de β -2 microglobulina humano o humanizado. Se describen roedores modificados genéticamente a modo de ejemplo que expresan un polipéptido MHC I humano o humanizado y/o un polipéptido de β -2 microglobulina en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 13/661.159, presentada el 26 de octubre de 2012 y en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 13/793.812, presentada el 11 de marzo de 2013. Por lo tanto, en una realización, el roedor que comprende la proteína CD8 quimérica descrita en el presente documento puede comprender además un complejo MHC I humanizado, en donde el complejo MHC I humanizado comprende: (1) un polipéptido MHC I humanizado, por ejemplo, en donde el polipéptido MHC I humanizado comprende un dominio extracelular de MHC I humano y dominios transmembrana y citoplásmicos de un MHC I endógeno (por ejemplo, ratón), por ejemplo, en donde el MHC I humanizado comprende los dominios α 1, α 2 y α 3 de un polipéptido MHC I humano y (2) un polipéptido de microglobulina β 2 humana o humanizada (por ejemplo, el animal comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos establecida en los exones 2, 3 y 4 de una microglobulina β 2 humana). Tanto el MHC I humanizado como

los polipéptidos de la microglobulina $\beta 2$ humana o humanizada están codificados por secuencias de nucleótidos ubicadas en loci de microglobulina MHC I y $\beta 2$ endógenos, respectivamente; el animal no expresa polipéptidos de microglobulina MHC I y $\beta 2$ endógenos funcionales. Por lo tanto, el MHC I expresado por los animales puede ser un polipéptido MHC I humano/roedor (por ejemplo, humano/ratón). Una porción humana del polipéptido MHC I quimérico puede derivar de una proteína HLA clase I humana seleccionada del grupo que consiste en HLA-A, HLA-B y HLA-C, por ejemplo, HLA-A2, HLA-B27, HLA-B7, HLA-Cw6 o cualquier otra molécula HLA clase I presente en una población humana. En la realización, en donde el animal es un ratón, una porción de roedor (es decir, un ratón) del polipéptido MHC I quimérico puede derivar de una proteína MHC I de ratón seleccionada de H-2D, H-2K y H-2L. En un aspecto, el roedor que comprende el CD8 humano/roedor quimérico descrito en el presente documento y la microglobulina MHC I y/o $\beta 2$ humanizada descrita en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 13/661.159 y 13/793.812 pueden generarse criando un animal que comprende un locus CD8 quimérico (por ejemplo, locus CD8 α y/o β quimérico) como se describe en el presente documento con un animal que comprende un locus de MHC I y/o $\beta 2$ microglobulina humanizado. El roedor también se puede generar mediante la introducción en células ES de un roedor que comprende el locus MHC I humanizado y/o $\beta 2$ microglobulina una secuencia de nucleótidos que codifica CD8 quimérico (por ejemplo, CD8 α y/o β quimérico), por ejemplo, para el reemplazo en el locus CD8 endógeno (por ejemplo, locus CD8 α y/o β quimérico); o la introducción en células ES de un animal que comprende un locus CD8 quimérico (por ejemplo, locus CD8 α y/o β quimérico) una secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican MHC I humanizado y/o microglobulina $\beta 2$.

También se proporciona en el presente documento un método para fabricar un roedor diseñado genéticamente descrito en el presente documento. El método da como resultado un roedor que comprende en un locus CD8 endógeno una secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido CD8 α y/o CD8 β humano/roedor quimérico. El método puede utilizar una construcción directora preparada usando la tecnología VELOCIGENE®, introduciendo la construcción en las células ES, e introduciendo los clones de células ES dirigidas en un embrión de ratón utilizando la tecnología VELOCIMOUSE®, como se describe en los Ejemplos.

En una realización, la invención proporciona un método para modificar un locus CD8 de un roedor para expresar un polipéptido CD8 humano/roedor quimérico descrito en el presente documento. En un aspecto, también se proporciona un método para modificar un locus CD8 de un ratón para expresar un polipéptido CD8 humano/ratón quimérico que comprende reemplazar en un locus CD8 endógeno de un ratón una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 de ratón endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 humano/ratón quimérico. El polipéptido CD8 es una combinación de CD8 α y CD8 β . En un aspecto, el polipéptido quimérico comprende todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un polipéptido CD8 humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD8 de ratón endógeno.

Por lo tanto, también se describe una construcción de nucleótidos para generar animales modificados genéticamente descritos en el presente documento. En un aspecto, la secuencia de la construcción de nucleótidos comprende brazos de homología 5' y 3', un fragmento de ADN que comprende la secuencia CD8 α o CD8 β humana, y un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación. En algunas realizaciones, la secuencia humana comprende intrones y exones de CD8 α o CD8 β humanos, por ejemplo, exones que codifican el dominio extracelular del CD8 α o CD8 β humano, respectivamente. En una realización, los brazos de homología son homólogos a la secuencia de roedor CD8 α o CD8 β . Algunas construcciones a modo de ejemplo para CD8 α y CD8 β se representan en las Figuras 4 y 3, respectivamente.

Debido a la cercana localización cromosómica de los genes que codifican CD8 α y CD8 β , la selección secuencial de los dos genes mejora las posibilidades de una humanización exitosa. En una realización, la estrategia de direccionamiento comprende la introducción de la construcción CD8 β quimérica descrita en el presente documento en las células ES, generar un ratón desde las células ES diana, derivar células ES modificadas genéticamente de dicho ratón, e introducir la construcción de CD8 α quimérica descrita en el presente documento en dichas células ES modificadas genéticamente. En otra realización, la estrategia de direccionamiento comprende la introducción de una construcción CD8 β quimérica descrita en el presente documento en las células ES, seleccionar las células que han incorporado la construcción quimérica de CD8 β , introducir una construcción de CD8 α quimérica descrita en el presente documento en células ES que han incorporado y que albergan la construcción de CD8 β quimérica, y seleccionando las células que han incorporado tanto CD8 β como CD8 α quiméricas. En un aspecto de esta realización, las etapas de selección se realizan utilizando diferentes marcadores de selección. En realizaciones alternativas, la humanización de CD8 α se puede lograr primero. Tras completar el direccionamiento del gen, las células ES de roedores modificados genéticamente pueden cribarse para confirmar la incorporación exitosa de la secuencia de nucleótidos exógena de interés o la expresión de un polipéptido exógeno mediante varios métodos (por ejemplo, los métodos descritos anteriormente para la humanización de CD4, por ejemplo, la modificación del ensayo de alelos descrito en Valenzuela et al., *supra*).

En un aspecto, se proporciona un método para hacer una molécula de CD8 humana/roedor quimérica (por ejemplo, CD8 α y/o CD8 β), que comprende expresar en una sola célula un polipéptido o polipéptidos de CD8 quiméricos de una construcción o construcciones de nucleótidos como se describe en el presente documento. En una realización, la construcción de nucleótidos es un vector vírico; en una realización específica, el vector vírico es un vector lentivírico. En una realización, la célula se selecciona de una célula CHO, COS, 293, HeLa y una célula retiniana que

expresa una secuencia de ácido nucleico vírico (por ejemplo, una célula PERC.6™).

Uso de animales CD4 y CD8 modificados genéticamente

5 Los roedores modificados genéticamente, por ejemplo, ratones o ratas, que comprenden CD4 y MHC II humanizados o CD8 y MHC I humanizados, presentar los péptidos a las células T (células CD4+ o CD8+ T, respectivamente) de manera humana, ya que, sustancialmente, todos los componentes del complejo son humanos o humanizados. El roedor modificado genéticamente de la invención se puede usar para estudiar la función de un sistema inmune humano en el roedor humanizado para la identificación de antígenos y epítomos de antígenos que
10 provocan una respuesta inmune (por ejemplo, epítomos de células T, por ejemplo, epítomos únicos de cáncer humano), por ejemplo, para su uso en el desarrollo de vacunas; para la identificación de células T de alta afinidad con patógenos humanos o antígenos del cáncer (es decir, células T que se unen al antígeno en el contexto del complejo MHC I humano con alta avidéz), por ejemplo, para su uso en terapia adaptativa de células T; para evaluar candidatas de vacunas y otras estrategias de vacunas; para estudiar la autoinmunidad humana; para estudiar las
15 enfermedades infecciosas humanas; y de otro modo para idear mejores estrategias terapéuticas basadas en MHC humano y expresión de CD4/CD8.

Por lo tanto, Los roedores modificados genéticamente de la presente invención son útiles, entre otras cosas, para evaluar la capacidad de un antígeno para iniciar una respuesta inmune en un ser humano, y para generar diversos
20 antígenos e identificar un antígeno específico que se pueda usar en el desarrollo de vacunas humanas.

En el presente documento se describe un método para determinar si un péptido provocará una respuesta inmune celular en un ser humano, que comprende exponer un roedor modificado genéticamente como se describe en el presente documento al péptido, permitiendo que el roedor monte una respuesta inmune, y detectar en el roedor una
25 célula (por ejemplo, una célula T CD8+ o CD4+, que comprende un CD8 o CD4 humano, respectivamente) que se une a una secuencia del péptido presentado por una molécula de MHC I o II quimérico humano/roedor como se describe en este documento. En una realización, el roedor después de la exposición comprende un linfocito T citotóxico (CTL) CD8+ restringido por MHC de clase I que se une al péptido. En otra realización, el roedor que sigue a la exposición comprende una célula T CD4+ restringida por MHC II que se une al péptido.
30

En el presente documento se describe un método para identificar un epítomo de células T humanas, que comprende exponer un roedor como se describe en el presente documento a un antígeno que comprende un epítomo de células T putativo, permitiendo que el roedor monte una respuesta inmune, aislando del roedor una célula T restringida por
35 MHC de clase I o clase II de MHC que se une al epítomo, e identificando el epítomo unido por dicha célula T.

En el presente documento se describe un método para identificar un antígeno que genera una respuesta de células T en un ser humano, que comprende exponer un antígeno putativo a un ratón como se describe en el presente documento, permitiendo que el ratón genere una respuesta inmune, e identificando el antígeno unido por la molécula restringida HLA clase I o clase II.
40

En el presente documento se describe un método para determinar si un antígeno putativo contiene un epítomo que, al exponerse a un sistema inmunitario humano, generará una respuesta inmune restringida por HLA de clase I o clase II, que comprende exponer un ratón como se describe en el presente documento al antígeno putativo y medir una respuesta inmune restringida a HLA clase I o HLA clase II específica de antígeno en el ratón.
45

Además, el roedor diseñado genéticamente descrito en el presente documento puede ser útil para la identificación de receptores de células T, por ejemplo, receptores de células T de alta avidéz, que reconozcan un antígeno de interés, por ejemplo, un antígeno de tumor u otro de la enfermedad. El método puede comprender: exponer el roedor descrito en el presente documento a un antígeno, permitiendo que el roedor monte una respuesta inmune al antígeno, aislando del roedor una célula T que comprende un receptor de células T que se une al antígeno presentado por un MHC I o MHC II humano o humanizado, y determinando la secuencia de dicho receptor de células T.
50

En el presente documento se describe un método para determinar la activación de células T por un agente terapéutico humano putativo, que comprende exponer un animal modificado genéticamente como se describe en el presente documento a un supuesto agente terapéutico humano (o por ejemplo, exponer una célula humana o humanizada que expresa MHC II o MHC I de tal animal a una secuencia peptídica del supuesto agente terapéutico), exponer una célula del animal modificado genéticamente que muestra un complejo MHC/péptido humano o humanizado a una célula T que comprende un CD4 o CD8 humano/roedor humano (por ejemplo, humano/ratón) capaz de unirse a la célula del animal modificado genéticamente, y medir la activación de la célula T que es inducida por la célula que exhibe péptidos del animal modificado genéticamente.
60

Además de la capacidad de identificar antígenos y epítomos de antígenos de patógenos o neoplasias humanos, los roedores modificados genéticamente de la invención pueden usarse para identificar autoantígenos de importancia para enfermedades autoinmunes humanas, por ejemplo, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, etc. Asimismo, los roedores modificados genéticamente de la invención pueden usarse para estudiar diversos aspectos de la
65

enfermedad autoinmune humana, y pueden usarse como modelos de enfermedad autoinmune.

Otros usos de los animales modificados genéticamente descritos en el presente documento, es decir, animales que comprenden un co-receptor de células T humano o humanizado (por ejemplo, CD4 o CD8 humano/roedor quimérico), que opcionalmente comprenden además una proteína MHC II o I humana o humanizada, será evidente a partir de la presente divulgación.

Ejemplos

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Estos Ejemplos se exponen para ayudar en la comprensión de la invención, pero no pretenden, y no deben interpretarse como, limitando su alcance de ninguna manera. Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de métodos convencionales que serían bien conocidos para los expertos en la materia (técnicas de clonación molecular, etc.). A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura se indica en grados Celsius y la presión es la atmosférica o casi atmosférica.

Ejemplo 1. Construcción y caracterización de ratones CD4 modificados genéticamente

Ejemplo 1.1: Diseño por ingeniería de un locus CD4 quimérico

El locus CD4 de ratón se humanizó en una única etapa mediante la construcción de un único vector director a partir de ADN (BAC) de cromosoma artificial bacteriano de humano y ratón usando la tecnología de VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 6.586.251 y Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. Nat. Biotech. 21(6): 652-659). Para generar el vector de direccionamiento, se llevaron a cabo una serie de recombinaciones homólogas bacterianas (BHR) que usan el ADN del Cromosoma Artificial Bacteriano (BAC), así como otras etapas de ingeniería.

En resumen, cuatro fragmentos de ADN (1) fragmento que contiene un péptido señal de ratón (codificado por los exones 2 y 3 del gen CD4 de ratón), (2) fragmento que contiene el exón 3 humano aguas abajo del péptido señal del ratón, (3) fragmento que contiene el casete de resistencia SPEC flanqueado por los sitios Asc I y P1-SceI y (4) fragmento que contiene 160 pb del intrón 6 de CD4 de ratón (intrón entre los exones 6 y 7), que comenzó aproximadamente 200 pb en dirección 3' del exón 6 de CD4 de ratón se unieron por ligación de infusión (Clonotech). El fragmento de ADN resultante contenía, de 5' a 3': exón 2 de ratón, intrón 2 de ratón, porción del exón 3 de ratón que contiene el péptido señal, exón humano 3 en dirección 3' del péptido señal humano, porción del intrón 3 humano, casete SPEC, porción del intrón 6 de ratón. Este fragmento de ADN se usó en BHR para modificar el clon BMQ391F08 de BAC de ratón para eliminar la secuencia de ratón que codifica los dominios 1-3 similares a Ig de CD4 de ratón y para introducir el exón 3 de CD4 humano. El casete CM del BAC se sustituyó por el casete SPEC dando como resultado el primer vector BAC (Figura 1, diagrama superior).

El BAC RP11-101F21 humano fue modificado por BHR para introducir el casete AscI-LoxP-PGK-neo-loxP 60 pb en dirección 3' del exón 3 humano, y para introducir el sitio de restricción P1-SceI y el casete SPEC aproximadamente 100 pb corriente abajo del exón 6, dando como resultado el segundo vector BAC (Figura 1, diagrama medio). Esta etapa se siguió por la ligación de BAC a BAC del primer y segundo vectores de BAC después de la digestión con las enzimas de restricción AscI y P1-SceI para generar el vector de direccionamiento de CD4 (Figura 1, diagrama inferior). Las uniones en dirección 5' y en dirección 3' de las secuencias ratón-humano y humano-ratón, respectivamente, se enumeran en la Tabla 1 a continuación y se establecen en el Listado de Secuencias. La secuencia a través del intrón humano 3 - unión de casete lox-neo (extremo 5' del casete) se establece en la SEQ ID NO: 55 y la secuencia a través de la unión del casete lox-neo - intrón humano 3 (extremo 3' del casete) se expone en la SEQ ID NO: 56; ambas secuencias también se enumeran en la Tabla 1. La secuencia completa de ácido nucleico de la pieza de CD4 humanizada, incluyendo el casete pgk-neo representado en la Figura 1 se establece en la SEQ ID NO: 3. El casete pgk-neo abarca los restos 307-2176 de la SEQ ID NO: 3, los dos sitios lox están ubicados en los restos 267-300 y 2182-2215, mientras que la secuencia humana abarca los restos 1-234 y 2222-18263. La secuencia de aminoácidos de la proteína CD4 humanizada completa se presenta en la SEQ ID NO: 4, abarcando la secuencia humana los aminoácidos 27-319 (establecidos en la SEQ ID NO: 57).

Tabla 1. Secuencias de unión del vector de direccionamiento de CD4 quimérico

Unión	Secuencia	SEQ ID NO
unión 5' ratón/humano	AGGGGAAACCCGCAAAGGATGGGACATAGGGAGACAGCTGTTAACAT CTGAAACATGACCTTCTTTTCTGTGCAGCACAACTCCTAGCTGTCCAC TCAAGGG (AAGAAAGTGGTGCTGGGCAAAAAGGGATACAGTGGAA CTGACCTGTACAGCTTCCAGAAGAAGAGCATACAATTCCACTGGAA AACTCCAACCAGAT)	1

(continuación)

Unión	Secuencia	SEQ ID NO
unión 3' humano/ratón	(CTGGTCACCTGGATGAAGTGAGGGAGGGCCCTCTGGGTTTGGGGCTGGTTTTGAAGTGAAGATCCATGAGCCAGCCCTGGGGCTGGCTTCACTGAAGATC) ATCTATGTCTGGGTGCGGAGAAAGAGGTAATGAAATGGCA CATGCTATGTACAAACTCTATTGCTGAGCAGCACCCAGTCTGAGCTGGCTCTGAATTGAGGGTGAAATTCACACATCTCCCCAACATCTATAATCTGG	2
Sitio humano/5' lox	(TATGGAGTGAAAGCCTTTGGTGTCTGAGATCTGGTCTTAGTTAAACTCTGGGATC) <i>GGCGCGCCGAATTCCTGCAGCCCGGGCTCGAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATATGCATCCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCC</i>	55
sitio 3' lox/humano	<i>AGTATTGTTTTGCCAAGTTCTAATTCCATCAGACCTCGACCTGCAGCCCTAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATCCTAGG</i> (CAGAGGGCTTGGGTTGACAGAACTCAGTGGCATTCTTATCCAGAGTTTCTTACACC)	56

Las secuencias humanas están entre paréntesis y la secuencia que contiene el sitio de la enzima de restricción (P1-Sce I) está en negrita. Las secuencias de selección de casete están en cursiva.

El vector de direccionamiento de CD4 humano se linealizó con NotI y se sometió a electroporación en células ES de ratón F1H4. Se identificaron células ES dirigidas que llevan un locus CD4 humanizado mediante genotipado utilizando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela et al.) que detectó la presencia del casete de neomicina y el gen CD4 humano, así como una copia del gen CD4 de ratón. Los cebadores y las sondas usados en el ensayo se muestran en la Tabla 2 a continuación y se exponen en el Listado de Secuencias.

Tabla 2. Cebadores y sondas para genotipado quimérico CD4

Región detectada	Ensayo	Cebador 5'	Cebador 3'	Sonda
Intrón 3 de CD4 de ratón (1765m2)	LOA	GAAGTGGGTGTGCC ATTCAGA (SEQ ID NO:5)	AAAGCTCAGAAGCA GACAGAGTCA (SEQ ID NO:6)	TTCCAAAAGCCTACA GCAGGCCAG (SEQ ID NO:7)
Intrón 5 de CD4 de ratón (1765m4)	LOA	TCATCTCCCCTTCC TGAACCT (SEQ ID NO:8)	CCCAGCCACAAGAA GAAGAAA (SEQ ID NO:9)	CTTCCCCCGCATCCA TTTTTCTGTTC (SEQ ID NO:10)
Intrón CD4 humano entre los exones 3 y 4 (en dirección 3' de pgk-neo) (1765h1)	GOA	GGTCTCGAACTCAT GAGCTCAA (SEQ ID NO:11)	GGCATAGTGACACA CACCTGTAATT (SEQ ID NO:12)	TGATCCACTCACCTT GGCCTCTCAGAG (SEQ ID NO:13)
Intrón CD4 humano entre los exones 5 y 6 (1765h2)	GOA	GTCAGGGAGCTTAC TTTCTTTGTTG (SEQ ID NO:14)	TGTTAGTGTCCCTG AGTAAGTGGATT (SEQ ID NO:15)	CTCAGCTCCACACCC CTACCAAGTTGG (SEQ ID NO:16)

El casete de resistencia a neomicina floxed se retiró mediante electroporación del plásmido que expresa la recombinasa Cre en células ES que contienen locus CD4 humanizado.

Se identificaron células ES dirigidas que tenían un locus CD4 humanizado sin marcador de resistencia mediante un genotipado que detectó la ausencia del casete de neomicina, la presencia de una copia del gen CD4 humano y una copia del gen CD4 de ratón.

Las células ES dirigidas anteriormente descritas se utilizaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en la fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 7.294.754 y Poueymirou et al. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1):91-99). VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ES donadora) que portaban independientemente un gen CD4 quimérico se identificaron mediante genotipado usando un ensayo de modificación de alelo (Valenzuela et al., supra) que detecta la presencia de las secuencias de gen CD4 humanas únicas.

Ejemplo 1.2: Expresión de CD4 quimérico en ratones genéticamente modificados

Los bazos de ratones TS o CD4 humanizados heterocigotos ("1766HET") se perfundieron con Colagenasa D (Roche Bioscience) y los eritrocitos se lisaron con tampón de lisis ACK. La expresión en la superficie celular de CD4 humano

o CD4 de ratón se analizó mediante FACS usando anticuerpos CD4 antihumanos o CD4 anti-ratón, respectivamente. Como se representa en las Figuras 2A y 2B, el CD4 humano se expresa en la superficie de las células T obtenidas de ratones heterocigotos para el CD4 humanizado descrito en el presente documento.

5 Ejemplo 2: Construcción y caracterización de ratones CD8 modificados genéticamente

La proteína CD8 se produce como un homodímero con enlace disulfuro (por ejemplo, un homodímero CD8α) o un homomultímero de dos subunidades o como un heterodímero de dos proteínas, CD8α (CD8a) y CD8β (CD8b). Los genes CD8α y CD8β están colocalizados en el genoma, por ejemplo, en el cromosoma 6 del ratón, se encuentran a unos 37 kb de distancia unos de otros. Este vínculo tan estrecho hace que sea muy difícil generar un ratón modificado genéticamente que comprenda humanizaciones en los loci CD8α y CD8β por cruce. Por tanto, la dirección secuencial, introduciendo primero un gen, por ejemplo, CD8β, seguida de la introducción del segundo gen, por ejemplo, CD8α, se realiza.

15 Ejemplo 2.1: Diseño por ingeniería de un locus CD8β quimérico

El locus CD8b de ratón se humanizó en una única etapa mediante la construcción de un único vector director a partir de ADN de cromosoma artificial bacteriano (BAC) de humano y ratón usando la tecnología de VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 6.586.251 y Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. Nat. Biotech. 21(6): 652-659). El ADN de BAC RP23-431M6 fue modificado por BHR para generar un gran vector de direccionamiento (LTVEC), MAID 1737, para contener un reemplazo de los exones del ratón 2-3 que codifican el ectodominio CD8 (desde la unión 5' en el intrón 1 hasta la unión 3' en el intrón 3), con secuencias humanas homólogas (Figura 3). Se insertó un casete loxp-Ub-Hyg en la unión 3' en el intrón 3. La secuencia de nucleótidos en varias uniones del vector resultante se enumeran en la Tabla 3 y se exponen en el Listado de Secuencias. La secuencia completa de aminoácidos de la proteína CD8β humanizada se expone en la SEQ ID NO:53; con secuencias humanas que abarcan los aminoácidos 15-165 (establecidas en la SEQ ID NO:58).

Tabla 3. Secuencias de unión del vector de direccionamiento quimérico CD8β

Unión	Secuencia	SEQ ID NO
Ratón/humano en el intrón 1	TGTTTGCCCTGTGACATGAACTCATTGTGACACAAACCCTGTGC TAGGGGG GGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCG CCC (TCGCAAGGGCCAGGCATATAAGTACACAATAAACAAATGG CAGCTCTCTCC)	17
Humano/5' del sitio lox en el intrón 3	(CCCCTCCTTCCTTCCCCAGGCACTTTCCAAGTGTCAACTCTAG AGCCTAT) CGCGCCGCACCGGT <i>ATAACTTCGTATAATGTATGC</i> <i>TATACGAAGTTAT</i>	18
3' del sitio lox/ratón en el intrón 3	<i>ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT</i> GTTCGACGTAG CCTATTTCTCTAGATCCAAAATGATGACAACAAAAGGTACCTTG TG	19
Las secuencias humanas están entre paréntesis, los sitios lox están en cursiva y los sitios de enzimas de restricción, los sitios de clonación múltiple y las secuencias derivadas de vectores están en negrita.		

El vector de direccionamiento se electroporó en células ES de ratón F1H4 (Figura 5, lado izquierdo). Se identificaron células ES dirigidas a un locus CD8b humanizado mediante genotipado usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela et al.) que detectó la presencia del gen CD8b humano. Los cebadores y las sondas usados en el ensayo se muestran en la Tabla 4 a continuación y se exponen en el Listado de Secuencias.

Tabla 4: Cebadores y sondas para genotipado de CD8β quimérico

Región detectada	Ensayo	Cebador 5'	Cebador 3'	Sonda
Exón 2 de ratón	LOA	GCAGCTCTGCCCTCATT AG (SEQ ID NO:20)	CATCTTTGCCGTAT GGTTGGT (SEQ ID NO:21)	CCCCTTCGTCCCTGC TGGTTCA (SEQ ID NO:22)
Exón 3 de ratón	LOA	CAAGAAGACTACCCTGAA GATGAAGA (SEQ ID NO:23)	TGTGAGTGCAACAA TGGAAACT (SEQ ID NO:24)	CGTTCACCCACCCAG AGACCCA (SEQ ID NO:25)
Exón 2 humano	GOA	GGCACCGAGCAGTGACAG T (SEQ ID NO:26)	TTCACCGTGGATAG TCCCTTTT (SEQ ID NO:27)	AGTTCCTGGCCCTCT GGGATTCCG (SEQ ID NO:28)
Exón 3 humano	GOA	TTGCTTTCTTTCTGTAGT TGATTTCC (SEQ ID NO:29)	CCGGCACACTCTCT TCTTGAG (SEQ ID NO:30)	TCCCACCACTGCCCA GCCCA (SEQ ID NO:31)

(continuación)

Región detectada	Ensayo	Cebador 5'	Cebador 3'	Sonda
Hyg	GOA	TGCGGCCGATCTTAGCC (SEQ ID NO:32)	TTGACCGATTCCTT GCGG (SEQ ID NO:33)	ACGAGCGGGTTCGGC CCATTC (SEQ ID NO:34)
LOA = pérdida de alelo; GOA = ganancia de alelo.				

Las células ES dirigidas anteriormente descritas se utilizaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en la fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 7.294.754 y Poueymirou et al. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1):91-99). VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ES donadora) que portaban independientemente un gen CD8b quimérico se identificaron mediante genotipado usando un ensayo de modificación de alelo (Valenzuela *et al.*, *supra*) que detecta la presencia de las secuencias de gen de CD8b humanas únicas.

El casete de selección puede retirarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, las células ES que llevan el locus CD8b humano/ratón quimérico se pueden transfectar con un constructo que expresa Cre para retirar el casete de higromicina "loxed" introducido por la inserción de la construcción de direccionamiento que contiene secuencias del gen CD8b humano. El casete de higromicina puede retirarse opcionalmente cruzando ratones que expresan recombinasa Cre.

Opcionalmente, el casete de higromicina queda retenido en los ratones. En una realización, el casete se eliminó para generar MAID 1739.

Ejemplo 2.2: Diseño por ingeniería de un locus CD8 α quimérico

El locus CD8 α de ratón se humanizó en una única etapa mediante la construcción de un único vector director a partir de ADN de cromosoma artificial bacteriano (BAC) de humano y ratón usando la tecnología de VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 6.586.251 y Valenzuela et al., *supra*). El ADN de BAC RP23-431M6 fue modificado por BHR para generar un gran vector de direccionamiento (LTVEC), MAID 1738, para contener un reemplazo de los exones de ratón 1-2 que codifican el ectodominio CD8 α (de la unión 5' en el codón 27 de Ala en el exón 1 de ratón a la unión 3' en el intrón 2 de ratón), con las secuencias humanas homólogas (de la unión 5' en el exón 2 humano a la unión 3' en el intrón 3 (Figura 4)). Esto conserva la secuencia líder del ratón al comienzo del exón 1. Se insertó un casete lox2372-Ub-Neo en la unión 3' de las secuencias de humano/ratón. Las secuencias de nucleótidos en diversas uniones del vector resultante se enumeran en la Tabla 5 y se exponen en el Listado de Secuencias. La secuencia completa de aminoácidos del polipéptido CD8 α humanizado se expone en la SEQ ID NO: 54, abarcando la secuencia humana los aminoácidos 28-179 (establecidos en la SEQ ID NO: 59).

Tabla 5. Secuencias de unión del vector de direccionamiento quimérico CD8 α

Unión	Secuencia	SEQ ID NO
Ratón/humano en el exón 1 (ratón) y exón 2 (humano)	TGAACCTGCTGCTGCTGGGTGAGTCGATTATCCTGGGGAGTGG AGAAGCT (AGGCCGAGCCAGTTCCGGGTGTCGCCGCTGGATCG GACCTGGAACCTGGG)	35
Humano/5' del sitio lox 2372	(ATGCCAGGGACAGCCCTGATACTGTAGGTAGAGTCAAGGGCT GTCCAAGT) ACCGGT ATAACTTCGTATAAGGTATCCTATACGA AGTTAT	36
3' del sitio lox 2372/ratón	ATAACTTCGTATAAGGTATCCTATACGAAGTTAT CTCGACCTG ATCTTGAGGGAGACCTGGACCGGGAGACGTGCTGGGGGCAGG GTT	37
Las secuencias humanas están entre paréntesis, los sitios lox están en cursiva y los sitios de enzimas de restricción, los sitios de clonación múltiple y las secuencias derivadas de vectores están en negrita.		

El vector de direccionamiento CD8 α humanizado descrito anteriormente se electroporó en células ES de ratón que contenían un locus CD8b humanizado para crear células ES modificadas que comprenden loci CD8b y CD8 α humanizados (Figura 5). Se identificaron células ES dirigidas a un locus CD8 α humanizado mediante genotipado usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela et al.) que detectó la presencia del gen CD8 α humano. Los cebadores y las sondas usados en el ensayo se muestran en la Tabla 6 a continuación y se exponen en el Listado de Secuencias.

Tabla 6: Cebadores y sondas para genotipado de CD8 α quimérico

Región detectada	Ensayo	Cebador 5'	Cebador 3'	Sonda
Exón 1 de ratón	LOA	GATGCTCTTGGCTCTT CCAGAA (SEQ ID NO:38)	ATGAAGCCATATAGAC AACGAAGGT (SEQ ID NO:39)	CCAGCTCCAAACTCCC CCAGCC (SEQ ID NO:40)
Exón 2 de ratón	LOA	TCAGCCCCAGAGACCA GAAG (SEQ ID NO:41)	TCAATCGCTTGAGAGC ACCTAA (SEQ ID NO:42)	TTGTCTGGCCCCGTGGC TCA (SEQ ID NO:43)
Exón 2 humano	GOA	GCGGTTCTCGGGCAAG A (SEQ ID NO:44)	TCAGGGCCGAGCAGAA ATAG (SEQ ID NO:45)	ACACCTTCGTCTCAC CCTGAGCGA (SEQ ID NO:46)
Intrón 2 humano	GOA	GGTTCACCTCAACCTG TTTTCC (SEQ ID NO:47)	CGCTTCCAGGTGCGCT AA (SEQ ID NO:48)	ACCTGGGCCCTGCTTT CAAGCC (SEQ ID NO:49)
Neo	GOA	GGTGGAGAGGCTATTC GGC (SEQ ID NO:50)	GAACACGGCGGCATCA G (SEQ ID NO:51)	TGGGCACAACAGACAA TCGGCTG (SEQ ID NO:52)

LOA = pérdida de alelo; GOA = ganancia de alelo.

5 Las células ES dirigidas anteriormente descritas se utilizaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en la fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 7.294.754 y Poueymirou et al., *supra*). VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ES donadora) que portaban un gen CD8b quimérico y un gen CD8a quimérico se identificaron mediante genotipado usando un ensayo de modificación de alelo (Valenzuela et al., *supra*) que detecta la presencia de las secuencias de gen de CD8b y CD8a humanas únicas.

10 Como alternativa, el vector de direccionamiento CD8a humanizado descrito en el presente documento se electroporó en células ES de ratón que no contienen un locus CD8b humanizado para generar un ratón que comprende un locus CD8a humanizado solamente.

15 El casete de selección en el locus CD8a puede retirarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2.1 anterior. En una realización, el casete de selección se eliminó para generar el ratón MAID 1740.

Ejemplo 2.3: Expresión de CD8 quimérico en ratones genéticamente modificados

20 Los ratones heterocigotos para los genes CD8a humanizados (MAID 1740) y CD8b (MAID 1739) se analizaron para determinar la expresión de CD8 humano.

La expresión de CD8a y CD8b humanos fue claramente detectable en la superficie de las células T CD3+CD4- derivadas de los bazo de animales heterocigotos pero no de tipo silvestre (Figura 6).

25 La expresión de CD8a y CD8b humanos también fue detectable en la superficie de timocitos obtenidos de animales heterocigotos pero no de tipo silvestre (Figura 7).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
<120> Ratones con co-receptor de células T humanizados
- 35 <130> 2010794-0441
<150> 61/766.762
<151> 2013-02-20
- 40 <150> 61/890.915
<151> 15-10-2013
<160> 59
- 45 <170> PatentIn version 3.5
<210> 1

ES 2 736 052 T3

<211> 202
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Sintético

<400> 1

aggggaaacc cgcaaaggat gggacatagg gagacagctg ttaacatctg aaacatgacc 60
 ttcttttctg tgcagcacia ctcctagctg tcaactcaagg gaagaaagtg gtgctgggca 120
 aaaaagggga tacagtggaa ctgacctgta cagcttccca gaagaagagc atacaattcc 180
 10 actggaaaaa ctccaaccag at 202

<210> 2
 <211> 240
 <212> **ADN**
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Sintético

20 <400> 2

ctggtcacct ggatgaagtg agggagggcc ctctggggtt ggggctgggtt ttgaactgag 60
 acatccatga gccagcctgg ggctggcttc actgaagatc atctatgtcg ggtgcggaga 120
 aagaggtaat gaaatggcac atgctatgta caaactctat tgctgagcag caccagtc 180
 tgagctggct ctgaattgag ggtgaaattc acacattctc cccaacatc tataatctgg 240

<210> 3
 <211> 18263
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Sintético

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2957) .. (2957)
 <223> n es a, c, g o t

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3193) .. (3193)
 <223> n es a, c, g o t

40 <400> 3

ES 2 736 052 T3

aagaaagtgg tgctgggcaa aaaaggggat acagtggaac tgacctgtac agcttcccag 60
aagaagagca tacaattcca ctggaaaaac tccaaccaga taaagattct gggaaatcag 120
ggctccttct taactaaagg tagggttgcc tggctcccca tccagggagg aaaacacact 180
atggagtgaa agcctttggt gtctgagatc tggctcttagt taaactctgg gatcggcgcg 240
ccgaattcct gcagcccggg ctcgagataa cttcgtataa tgtatgctat acgaagtatt 300
atgcatccgg gtaggggagg cgcttttccc aaggcagtct ggagcatgcg ctttagcagc 360
cccgctgggc acttggcgct acacaagtgg cctctggcct cgcacacatt ccacatccac 420
cggtaggcgc caaccggctc cgcttcttgg tggccccttc gcgccacct ctactcctcc 480
cctagtcaag aagttcccc ccgccccgca gctcgcgctc tgaggacgt gacaaatgga 540
agtagcacgt ctactagtc tcgtgcagat ggacagcacc gctgagcaat ggaagcgggt 600
aggcctttgg ggcagcggcc aatagcagct ttgctccttc gctttctggg ctgagaggct 660
gggaaggggt gggccgggg gcgggctcag gggcgggctc aggggcgggg cgggcgcccg 720
aaggtcctcc ggaggcccgg cattctgcac gcttcaaaag cgcacgtctg ccgcgctgtt 780
ctcctcttcc tcatctccgg gcctttcgac ctgcagccaa ttgttgacia ttaatcatcg 840
gcatagtata tcggcatagt ataatacgac aaggtgagga actaaacct gggatcggcc 900
attgaacaag atggattgca cgcaggttct ccggccgctt gggaggagag gctattcggc 960
tatgactggg cacaacagac aatcggctgc tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg 1020
caggggcgcc cggttctttt tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag 1080
gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc acgacgggag ttccttgccg agctgtgctc 1140
gacgttgtca ctgaagcggg aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat 1200
ctcctgtcat ctacacttgc tcctgccgag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgagg 1260
cggctgcata cgcttgatcc ggctacctgc ccattcgacc accaagcga acatcgcatc 1320
gagcgagcac gtactcggat ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag 1380
catcaggggc tcgcgccagc cgaactgttc gccaggctca aggcgcgcat gcccagcggc 1440
gatgatctcg tcgtgaccca tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc 1500
cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata 1560

ES 2 736 052 T3

gcgttggcta cccgtgatat tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga ccgcttcctc 1620
 gtgcttttacg gtatcgccgc tcccgattcg cagcgcacgc ccttctatcg ccttcttgac 1680
 gagttcttct gaggggatcc gctgtaagtc tgcagaaatt gatgatctat taaacaataa 1740
 agatgtccac taaaatggaa gtttttcctg tcatactttg ttaagaaggg tgagaacaga 1800
 gtacctacat tttgaatgga aggattggag ctacgggggt gggggtgggg tgggattaga 1860
 taaatgcctg ctctttactg aaggctcttt actattgctt tatgataatg tttcatagtt 1920
 ggatatcata atttaaacia gcaaaaccaa attaagggcc agctcattcc tcccactcat 1980
 gatctataga tctatagatc tctcgtggga tcattgtttt tctcttgatt cccactttgt 2040
 ggttctaagt actgtggttt ccaaagtgtg cagtttcata gcctgaagaa cgagatcagc 2100
 agcctctggt ccacatacac ttcatctca gtattgtttt gccaaagtct aattccatca 2160
 gacctcgacc tgcagcccta gataacttcg tataatgat gctatacгаа gttatcctag 2220
 gccagagggc ttgggttgac agaaactcag tggcattctt atccagagtt tctctacacc 2280
 aactgctggt ggcccaggga aagggtgat gtgaatttca atattttaat atttaatatt 2340
 catgaactta ttttagtgag ttttagaaca atcactatca cttaaaaccg gtgatttctt 2400
 gagtattggt gctacagacc tatgtagata atactttgca cagtgactca tatgtataat 2460
 cctagcactg tgggaggctg aggccggagg attgcttgag tccaggagtt caagaccagc 2520
 ctgaacaaca tagtgagact ctgtctctat gaaaaaaaa atatatatat tttttttgga 2580
 gacaaggctc agttctatca cccaggctcc agtgcagtgg tgtgatctcg gctcactgca 2640
 atctccacct cccaggctca agtcatcatc ccacctcagc ctccaagta gctgggacta 2700
 caggcatgca ccacatgcc aggctaattt ttgtattttt tatagagaca gggtttcacc 2760
 atgttggcca ggctggtctc gaactcatga gctcaagtga tccactcacc ttggcctctc 2820
 agagtgtgg aattacaggt gtgtgtcact atgcctagcc aaaaaaaaa tttttaatta 2880
 aaaaaaaaaa ggccggctgt agtggctcac acctgtaatc cagaactttg ggagtttgag 2940
 gtgggcagat caccgnggt caggagttca agaccagtct ggccaacatg gtgaaaccgg 3000
 gtctctacta aaaatacaaa aattagccag gtgtgggggt gcagtcctgt acttccagct 3060
 actcaggagg ctgaggcagg agactcgctt gaacctggga ggcaaaggct gcagtgagct 3120
 gagattgcac cactgcactc cagcctgggt gacagagcaa gacttcatct caaaaaaaaa 3180
 aaaaaagctg canatttatt attattatta ttagtttatt tattttttt tttgagacag 3240
 agtctcgttc tgtcgcccag gctggagtgc ggtggcgtga tcttggctca ttgcaacctc 3300
 cacctccggg gttcaagtga ttctcctgcc tcagcctccc gagtagctgg gactacaggc 3360
 gtatgccacc atgcctggct aattttttgt acttttagta gagacagagt ttcacgggtg 3420
 tagccaggct ggtcttgatc tcctgacctc gtgatttacc ctcttggcc tcccaaagtg 3480

ES 2 736 052 T3

ctgggattac	aggcgtgagt	cactgtgccc	ggcccagaat	catttttttc	tacttttttt	3540
tttttgaggc	aaactctcga	tctgttgccc	aggctggagt	gcagtgggca	tgatcttggc	3600
tactgcaag	ctctgcctcc	caggttcaag	caattctcct	gcctcagcct	cctgagtagc	3660
tgggactaca	ggcgtgtgcc	accatgcccg	gctaatttgc	gtatttttag	tagagaccgg	3720
ttttcatcat	attggccagg	ctggcttga	actcctgacc	tcaagtgatt	ctcccacctt	3780
agcctcccaa	agtgctggga	ttacaggcat	gagctactgc	acttggcctt	ttctcctggt	3840
tttaaaacta	ttatatgctc	attacaaaat	at ttgg tcaa	tgaagaaaag	aatatggaag	3900
aaaatcaaat	gcatgcatac	ttctatcact	cagagatatac	ctctgctaac	at ttttgattg	3960
at tttcttcc	aatctttttt	tttttttttc	tttttgagac	agggctctcac	tctgctgccc	4020
aggctggagt	acagtggcat	gaccacaaca	catcacagcc	tcaagtgatc	ttcccacttc	4080
agccttccca	gtagctggga	ctacagggtc	acgccaccat	gttcacctaa	ttttttactt	4140
ttttagagaga	tgagacttca	ccatgttgct	caggctggtc	ttgaattcct	aggctcaagt	4200
gatcttcccg	ctttggcctc	ccaaagtgct	gggattatag	gtatgagcca	ctgcatgtgg	4260
cctat tttct	tccactgttg	ttcggcgtgg	agaatattat	atacataatt	acgtaaatga	4320
tatcatactg	tatatacctt	ttttcctact	ccttccttaa	gttatatcat	aatgagacta	4380
ccaattatta	gacttttttt	cttttttttg	agacggagtc	tcggtctgtc	acctaggctg	4440
gagtgcaatg	gcgcgatctc	agctcgctgc	aacctctgcc	tcccaggttc	aagcaattct	4500
gcctcagcct	cccgagtagc	tgggactaca	gacacgtgcc	accatgccc	gctaactttt	4560
ttat tttttt	attagagaca	gggttccacc	atgctagcag	gatggctctca	atctctcgac	4620
ttcgtgatca	gcccggcttg	gcctcccaa	gtgctgggag	tacagggtgtg	agccaccgca	4680
ctcggcctag	actaactatt	taaagtaatc	tggaatggtt	taacgaatac	aaaactctaa	4740
aacccttga	cctaataata	gctat ttttg	aaagtctact	tgacagaaat	aaaattgtga	4800
atattctttt	ttgttgtttt	tttgagacag	agtctcattt	ggacgcctag	gctggagtgc	4860
agtggcatga	tctcggctaa	ctgcaacctc	cacctcctgg	gttcaagtga	ttctcctgcc	4920
tcagcctcct	gagcagctgg	gattacaggt	gtgcaccacc	atgtctggct	aat ttttgca	4980
tttttagtag	atggggtttc	accatgttga	ccagggtggt	ctggaacttc	taccctcaag	5040
tgatctacct	accttggcct	cccaaagtgc	tgggattaca	ggtgtgagcc	accacgcctg	5100
accagtgaac	acttaataat	atctatggaa	aggtgttatt	ataagaattg	cttgtggggc	5160
cgggcgtggt	ggctcacgcc	tgtaatccca	gcactttggg	aggctgtggc	aggcggatca	5220
cgaggtcagg	agatcaagat	catcctggct	aacacgggtga	aacccgtct	ctactaaaaa	5280
tacaaaaaaa	ttagccaggc	gtggtggcgg	gcacttgtaa	tcccagctat	ccaggaggct	5340

ES 2 736 052 T3

gaggcaggag aattgcgtga acccaggagg cggaggctgc agtgagctga gaccgtgcca 5400
ttgcactcca gcctgagtga cagagtgaga ctccatcaca aaaaataaat aaataaataa 5460
ataaaatata aataagtaa taaaggtcag gagtgggtggc tcacgcctgt aatcccagca 5520
ctttgggagg ccgagggtga cagatcatga ggtcatgaga tcaagaccat cctggctaac 5580
acagtgaaac cctgcctcta ctaaaaatac aaaaagtcac ccagggtgtgg tggcacacac 5640
ctatagtccc agctacttgg gaggctgagg caggagaatc acttgaaccc aggaggcaga 5700
ggttgacgtg agctgagatc gcgccactac actccagcct aggcgacaga gcaagactct 5760
gtctcaaaat aaataaataa ataaataaat aaataaataa ataaataaaa taaaaagcac 5820
acacacacac acacacacac acacacaatg caaaagaccc accctactac aactaacatt 5880
atatttaatg gtgaaaaact gaattctttc tcctaagtg caggaataag acaaagatgt 5940
ctgctcttac tactcttatt caacataata ctgcaatccc ttgccagtgc aataaggcaa 6000
gaaaaatgaa ataaaaggaa aactgatcag aaagaaagaa ataaaactgt tcctatattgt 6060
ggatgacatg attacataga aatctcaaa gaatctgtaa gaaacttctt agaattaata 6120
aatgaattca tcaaggttgc agaataaag ataaacataa aaaatctatt gtatttctat 6180
atattagcaa ggaacatgtg tacacagaaa ttaaaactac aataccattt ataattgctc 6240
aaaagcca ggcaggtgg ctcacacctg taattcctgc actttgggag gccaaagggtg 6300
gaagattgct taagcccagg agttcaagac cagcccgggc aacatagtga gaccttgtct 6360
ctacaaaaag taaaaatta gctgagcatg gccgggtgca gtggctcact cctgtaaccc 6420
caacactttg ggaggctgag gcgggaggat catgaggtca ggagatcgag accatcctgg 6480
ctaacacggt gaaaccctgt ctctactaaa aacacaaaaa attagctgga tgtggtggca 6540
ggcgcctgta gaccagcta ctcggaagc tgaggcagga gaatggcgtg aacctgggag 6600
gcggagcttg cagtgagctg agattgtgcc actgcactcc agcctgggtg acacagtgag 6660
actacgtctc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaat tagctgagca ttatggtgta tgcctgtagt 6720
cccagctact ggggaggctg aggtgggagg attgcttgag ccctaggagg gcaaggctgc 6780
agtgagccat gatcacacca ctgctttcca gcctcggtag gagagcaaga ccctatctca 6840
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agaaaagaaa agaaaagaaa agaaaaagaa agagagaaaag 6900
aaataacttag gtgtaaactc aaaaaacatg cgtagggcca ggtgcagtgg ctcatgcctg 6960
taatcccagc actttgggaa gttgaggctg gcggatcact tgaagtcggg agtttgagac 7020
cagcctggcc aacatggtga aaccccgtct ctactaaaaa tgcaaaaatt aggcaggtgt 7080
tgtggcgcac gcctgatccc agctactttg gaggctgagg caggagaatt gcttcaaccc 7140
gggaggcaga ggttgacgtg agccaagact gttccactgc actccagcct gggcaacaga 7200
gtaagagtct gtctcccga aaaaaaaaaa agaaaaaaga aagcattgaa ttgtatgcta 7260

ES 2 736 052 T3

aaaactacac gatgctgatt aaagaagtca aagaagatct aaatatatgg agagacatgc 7320
 tgtactcatg gattgatgga ttggaagact caacataaga cagatatcaa ttttcccaaa 7380
 attaataac aagtttaatc caattcctat aaaaatacca gcaagatfff ttgtagatat 7440
 aaacaagttg gccaggtgta gtggcttaca cctgtaatcc tagcactttg ggaggctgag 7500
 gtgggaagat cgcttgagcc caggtgttca cgactgcagt gagctatgat tgtgtcactg 7560
 cattccagct ggcaactccag cctaagtgac aaaggagac cctgtctcaa aaacaaaaaac 7620
 aaaacccaaa taatfffgtc ctgcaaaatc cctattaaga agaagaaaag aggctgggca 7680
 cagtggctca ccgctgtaat cccagcacgt tgggaggctg aggcaggctg atcacttcag 7740
 cccagaagtt tgagatcagc ctgggcaaca tgaggaaacc ccgtctctac caaaaaaaaaa 7800
 aaaaggtaca tacacacaca cacacacaca cacacacata cacaagtata tacacatata 7860
 tatacacata caggtgaata gatgtatata catctatffa ttgtgaatat acatctatac 7920
 acacacgtgt gtgtacacat atatffaaaa tffatffffa tffatffatt tatffttgag 7980
 acagagtctt gctctgtcac ccaggctggg tgcacctgta ffcccaacga cacaggaggc 8040
 tgaggfggga gaatcactga gccaggfagg cagaggttgc agtgagccaa gatgttgcct 8100
 ggttgcctgg gcaacagagc gagaccctat atcaaaaaag aagaataata agaaaaagaca 8160
 gtttacagaa tataagaaaa tatatfcaca atccacatac ftagcaagg actggtatct 8220
 agaatatgat aaacaactct caaaactcaa aaccaaaaaa atgaacaatt caattagaaa 8280
 acaggccgaa aaggacatac agttggcaaa taagcacatg aaaagttgff caacatcatt 8340
 aatcattagg gatatgtaca ftaaaaccac aataggctat cactaaacct atcagaatgg 8400
 ctaaatacaa aattggaaca ccaccaaatg ctgatgagga tgtggagaaa ctgggtcatt 8460
 cffccaatat tggfgggagg ctaaaatggc aaagccactc tggaaaacag fffgatagtt 8520
 fctfataaaa caaaacatgc ggccgggagc ggtagctcac gcctgtaatc ccagcactff 8580
 gggaggccga ggagggtgga fcacgaggtc aggagatcga gaccatcctg gctaacacgg 8640
 tgaaaccctg fctctactaa aaatacaaaa aattagccgg gcgtggfggc gggcgcctgt 8700
 agfcccagct actcgggagg ctgaggcagg agaatggtgt gaaccggga ggcggagctf 8760
 gcagfagcc gagatcgcgc cattgcactc caacctggga gacggaggga gactccgtct 8820
 caaaaaaca aaaacaaca acaaaaaaac atgcaacaat ccagcaatat tgcaccctca 8880
 ggcatffatc ctagagcaat gaagactffat gccacacaa aaagctgcac acaaatgffc 8940
 atagcagctf tatfcaggt agccaacaat tagaaacaat ctagatgtcc ffcaactggt 9000
 gaatgattac atccatacca cgaaatactf ffagcaata aaaaggatga atcatagfca 9060
 acaccacaac ctggatgaat cffcaggga ffatgctgag tgaaaaaaag ccaatctcaa 9120

ES 2 736 052 T3

aaggtaatat actgtattaa tccatttata taacattctt aaaataacta attatagaaa 9180
tggagaacag atgagtgatt gccaggggtt aaggggctca gggatgggga ggggaagggg 9240
tatggctaca aaaagcaaca accttatggc gccggaaatg ttctgtattc tgattgtgtc 9300
aatgtgagca tactggttga gatatagtgc tacagttttg caagttatta ccatcagagt 9360
aaactggata gagggcacat aggatttctc tgtattactt cttacaactg caagtgaatc 9420
tacaattatc tcaaaataat aagtttagtt taatgctagg cgtgggtggct cacatctgta 9480
atctcagctc tttgggaggc tgagacgggt ggatggcttg agtccaggag ttcgagacca 9540
gcctggccaa catggcaaaa ccggtctcta ctaaaaatac aaaaattagc tgggcgtggt 9600
ggcaagtgcc tgtagtccca gctactcggg aggctgaggc aggagaattg cttgaacccg 9660
ggaggtggag gttgcagtga gccgagatca cgccactaca ctgtagcttg ggcgacagag 9720
tgaggctctt tctcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaagc aggcaggcag ggccaggaaa 9780
gcgtataatt tttgtagttc aaatgactaa cctaaaaagt gaagattggc caggcgcagt 9840
ggctcacgcc tgtaatccca gcactttggg agccaaggc ggggtgatca cgaggtcagg 9900
agattgagcc actctggcta acacagtgaa acccctctc tactaaaata caaaaaatta 9960
gctgggcgtg gtggcacccg cctgtagttg cagctacttg ggaggctgag gcaggagaat 10020
cacttgaacc caggaggcga agttgcagcg agccgagatc aactactgc actccagcct 10080
gggtgacaaa gtgagattct gtctcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaagtg 10140
aagtttacct ttttttttaa atttttcttc ttttccttcc ctactttgtg agataatttt 10200
cttcttttta aaaagccaag agcttacttc tgtaagtaaa gattatctta agacaactta 10260
gaaatgtata ttattagtat tttctatctc attgtaagtt atttgtaaat attggttttg 10320
gtgctaacct agaattccat caaattaatt gtccccta atatggccat tatcattttg 10380
tctaacattg tctcctatta acaatgctgt aagtattatt tttgtagcta aattatggtt 10440
tgcattttta aattattggt ttaaggataa agttccagaa atgaaattaa ggatatgaac 10500
tttttgagca catcttgtca gcactgagta gtattattta aaacttttg ggggggcaat 10560
tttataattg aaaaatata cattgtttta atttgcattt ctttactgc ctatgagatt 10620
aaaacaatgc actactttcc aaaaattctt aagtcttttg tgttgatgct tttgttctgt 10680
ttctatggat ctcatcttcc ttcagaacag ctccccttcc caacttcctg atttctaaca 10740
ataacagtat caccctcctt gttctcccaa tttctgaaac acagagtc atgtttttct 10800
ctgcttcaat ccctggttcc ctatcgtcat caattatgac ctttcttgc tttgaaagtg 10860
ttttgggccg ggcattgatg ctgccaccta ttgtaatcct agcacttttg gaggtgagg 10920
cggctggatg acttgacctg aggatttcga gaccagcctg ggcaacaggc cgaaacctcg 10980
tctctacaaa aaatacaaaa gttagtcggg agtgggtggca catgcttgta gtcccagtta 11040

ES 2 736 052 T3

cttggggggc tgaggtggca ggatctcttg agcccacgag gtagatgttg cagtgagccg 11100
 tgattgcgcc actgcacccc agcctaggtg acagagtgag accctgtctc aaaaaaaaaa 11160
 aaatgttcta gtttcttcct cttctttggt cccatgggaa tgccaccatc accagccaag 11220
 gctcacatac ctcccacctg gattacagtg agcttccagg taatttggtc tgctactagt 11280
 ctcgcctact tggatttccc tccccctgc tgcagcattg ccttccaaag ccatgctttg 11340
 cacatgccac atcctagccc attagactaa gcctagaagc ctctgcagga cgttcacctc 11400
 ctcagcgcca ctgctcagtt tcccagtgga aacctctgca cccaggaggt tccccacag 11460
 cttgcctgtg ctgcctctct ggagcttttc tcccttctg taatgtcctt gctgctcccc 11520
 gtctctagtc cattgcctat acctcttttt tttttttttt ttgagatgga gtctctctct 11580
 ctcatccagg ctggagtgca gtggcgcgat ctcggtcac tgcaaccttt gtctcctggg 11640
 ttcaagggat tctcctgcct cagcctcccg agtaactggg attacaggcg tgcaccacca 11700
 ttcctggcta atttttgtat ttttagtaaa gactgggttt caccatgttg gccaggctgg 11760
 tcttgaactc ctgccctcag gtgatccacc tgcctcggcc tcccagagtg ctgggattac 11820
 aggcgtgagc caccgcacct gccacaggcc catacctctt ttaagtcttc attcaatacc 11880
 agttgtcca tgaatttgtc ccagactcac tcatatgctt agacctttca tattatcttg 11940
 ccatagcttt ttcaaagtat gggacagcat ggacaagcag gccatggttt tcttttgaag 12000
 agaagcaagg aggcagagtt attttaggag gagggttata catttcattt tgaaccaatt 12060
 gcgtttgggg tgatggcagg atattaacat aaacttattt cttggaccat tggaaatgtg 12120
 tgcctagaac tgaggagaga ggtcagggct ggcagtaaca acttggccac aatctgcaga 12180
 gctgactggg gatgaggtgg aatttagaat gtctgtagaa acggggaaga gaaccaaaaga 12240
 cagagtctgg gacaacacct aaatgtagat gtcagagcaa gagttcaaga cgaagaaaaa 12300
 cgaatcatac ttagaaatgg aggggaggaa caaaagaggc ggagcaaagt ggggcagaac 12360
 cagagtaggc cacgctttta agaagtttg taaaggaact gtgaaaggaa tgtagttgaa 12420
 tttcagggta agctggggaa ttaaagcagt gtgtagatcc agggcaaaca gcaagtaggg 12480
 caggaaccac tgaaggaaca aataaagggg gaggttgggt ccaggttgtc ttgagtaggg 12540
 aagttttttt aaaaagtgtg aaactgaagg tgtgggtggt attgggtgcc tgccgtgctc 12600
 tgaggaagct tggggcaact gtgtgctgag gctgtgaggt tgtctggaag gggctcctgg 12660
 acagtaagag ctgagcagtg gggaagagga ctgtgtggtc tggaagagga gagaaaggag 12720
 agtgagtgac tgaactggta tccaggctcc cacaccaagg cagaaagagg gagaggacct 12780
 gggcatctca gggaggcaga ggcagtagca agcagggtga gaggctttag tcttagccac 12840
 ctttgcccca ttctccaaa tatacattct aagtaaaaac aaaacaaaac agaactgttt 12900

ES 2 736 052 T3

gctatgtaaa tttagcttct aaagccctgt tctacagaga ttttgagct tccactgcac 12960
ccagaaaatg cacagctaaa gagaaaactt cccttgggtga tggttattag attttacaag 13020
aagaggccaa aggagacaca tacttatgcc agaagaactt tccagagata gcattgcata 13080
gcgaaatagc ctgaattatt tttatttttt aaaacatttt ttcttttctt ttttcttttc 13140
tttttctttt tttttttttt tttttgagac agagtctcac tctgtcacc caggctggagt 13200
gcagtggcgt gatcttggct cactgcaatc tccacctccc gggttcaagc cattctctc 13260
cctcagcctc ccaagtagct gggattacag gcatgcgtca ctatgctctg gctaattttt 13320
tttttctttt ttttttgggt attttttagta gagatggggt ttcacatgt tggccaggct 13380
ggtcttgaac tctgacctc aagtgatcca ccgcttggc ctcccaaagt gctgggattt 13440
caggcgtgag ccaccgcacc cggccaaaaa tttcttttct ttaagatgag gcctcactct 13500
gttgcccagc ctggagtgca gtgttacaat catagctcac tgtaactttg aactcctggg 13560
ctcaagtgat cctcctgctt cagcctctca agtagctggg attacaggca tgtgccacca 13620
caaccagcta atttttttta aaataatttt ttttagagac gagggctctcg attggctgcc 13680
taggttggtc ccagactcct gacgggctgc attttaatcc tagctccacc acttacggga 13740
gtcaaaattc aaaagataga aaagggcata taggctgggt gcagtggctc acacctgcaa 13800
tcccagcaat ttgggaggct gaggtgggcg ggttgcttga ggtcaggagt tcgagatcag 13860
cctgggcaac atggcaaaac ttgtatctac taaaaataca aaaattagcc agatgtgggt 13920
gtgtacacct gtaatcccag ctactccgaa ggctgaggca agagaatccc ttgaactcag 13980
gaggcagagg ttacaatgag cagagatcga aactcagact ccataaaaac aaacaacaa 14040
aaaaagaaag caggctgggt gtggtggctc acgctgtaa cccagcact tcgggaggcc 14100
aaggcgagcg gatcacctga ggttgggcat tcgagaccag cctgaccaac aaggagaaac 14160
cctgtctcta ctgaaaatac aaaattagcc gggcttgggt gcgcatgcct gtaatctcag 14220
ctactcggga ggcagaggca agataattgc ttgaaccgag gaggcggagg ttgcgggtgag 14280
ccaagatcat gccattgcac tccaacctgg gcaacaatag cgaaactcca tctcaaaaaa 14340
aaaaagcaa agggcatata gtgaaaagct ttcttcctac acatgagtat tcacttctc 14400
ttcctagagg caaccaaggt tattttttgt tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 14460
tgttttggga cagtctcact ctctcaccaa ggctggaatg cagtgggtgcg atctcactgc 14520
aaactctgcc tccagctctc aagcgatctt gtgcctcagc ctcccagttt tttttcttt 14580
taaatggggt ctcatctgt cgcccagggt ggagtgcagt ggcattgatca tagctcactg 14640
cagcctcgac ctctgggtc aggttatcct cccacctcag cctccggcat agctggggct 14700
actggcatgc accaccacac tcagttaatt tttttcttt tttgagacag agtctcactc 14760
tgtcacctag actggagtgc agtggtgcca tctcatttgt ttcactgcaa cctttgactt 14820

ES 2 736 052 T3

ctgggctcaa gtgattctcc cacctcagcc tccaaggcg gctaattaaa aaaaattttt 14880
tttttttttt ttttagagat ggggtttcgc catggtgccc aggctgatct cgaactcctg 14940
ggcacaaca atctttccac ctcgatcttt caaagagctg ggatgagaga tttccacat 15000
gcctggcctc attttctttt ttaatttttt ttttagacatt atagctcttt ttaatggcct 15060
cattttctta tgtttaattc gagaattatt cttttcatat acaaagaata tattttctcc 15120
acctttaaaa acaaatagta gactgtttaa catctcgctt tattcagtta gtgatgtttc 15180
ttagatacgg gtccaaatta gtacacaaag cacttcctca ttcctctctt acggctgcat 15240
agcagtccac tgaatgggtg agctatgatc tatttaacct attctttatt gatggacatt 15300
tggttttgta tatacatttg taattctgta tagattacaa atcaccatcc aaagaaattg 15360
tactggttta ttctcctaca atgtgtgaga gttgggtaat tacttaatct caatatgtga 15420
gagtttaggc agttacctaa tctctctgag tctcagtttc tctatctgca aaataaacia 15480
aacagtgttg acagtatcta tttctcggaa ttattgtgga gattactgag atgatgcctg 15540
taaagtattt ggcatgtagg agttgggtgct ctccaaataa ggatagatt ttatttztat 15600
ttgtgagcta ctgtcccagc caggtaaag gatatgatga gacctccttg ccagaccggg 15660
tttctctgat tagaacgagg agcagatggt gcaggaaatt agcaactgat atcagaagag 15720
ccgtgggcat tctcttgcca gaggtgccct gtctccaggg cgcctcagtc ccccccata 15780
tgtcttctgc tcccaggtcc atccaagctg aatgatcgcg ctgactcaag aagaagcctt 15840
tgggaccaag gaaactttcc cctgatcatc aagaatctta agatagaaga ctcagatact 15900
tacatctgtg aagtggagga ccagaaggag gaggtgcaat tgctagtgtt cggatgtgag 15960
tggggcaggt ggggatgagg atacctcctg cctggttccc ttccccacta ctcccacccc 16020
tgcaccaa at ccagcctgag ctgggtgatac cgcagcagcc ccaagaggac caggctgtca 16080
aactggcctc caaatgtctt aaaacccttc ttgatcaggt gagggatgct ggtgggcgga 16140
ggagggaga ggccttgga aaaggaaaga aaagggaagg aggcaagga aggagggaga 16200
gagactgggg aagagaggat gaggggagag gaggaaagaa gagagagagg aggggagagg 16260
gaaaccctat ctgggctggg ggtgcgcagc tgggtgctgg gaggaaggag atgttgggac 16320
ggcgataatg gagagatggt gttggtttcc tgttgtctgc cttctcctt ggggatggtg 16380
tgtgtgtgac acagctggcc tttccctcca cagtgactgc caactctgac acccacctgc 16440
ttcaggggca gagcctgacc ctgaccttg agagcccccc tggtagtagc ccctcagtc 16500
aatgtaggag tccaaggggt aaaaacatac agggggggaa gacctctcc gtgtctcagc 16560
tggagctcca ggatagtggc acctggacat gcaactgtct gcagaaccag aagaagggtg 16620
agttcaaaat agacatcgtg gtgctaggta agggaagccc ctcttcgagc agtctcctcc 16680

ES 2 736 052 T3

ctgccccagg ggctgacagc ccctccctct gctctgactg ccctgtttct ggttctggtg 16740
ctgggagggtc aggagtggag aagactaggt cccctagagc tgaggcctgt cttgaaggac 16800
tcaactggggc cctcatcctc agggggctga ttggcagcca cccctcagtg tggtagacat 16860
ggagaaagga aaggctgggg aaggtaagga tgctagaggc cggagtctcc tttggaggcc 16920
ccaaaggagg aatgtcaggg agcttacttt ctttggtgcc tcagctccac acccctacca 16980
agttggcaaa tccacttact cagggacact aacaccagta agccaaccct gatgatgttc 17040
tatgttgtag ctctggacct ctaagccagg ccaactgtgg gagaccaagg tcctaccca 17100
gatcctgtcc cctgggtgct tatgtgactt aaggtagaca taaggtagtg tgccagttta 17160
gtgcatgtac gctgattgaa atcctggttc tgccacaacc atgtgacctt gggtagtga 17220
ctaaacctct ctgcacctg gtttcagcct ctgtgaaatg gggatgatgt taactgcat 17280
agtgactacc tcgtattaag ttgaggactg atatacgtaa ggcactgaaa atggtagctg 17340
gcacagagta agccctagtt aagtgttcgc tgttattttg tgaagggtga tgaatacgcc 17400
tctaaggagt ggaggccaaa tggcttctgt ggtccaggaa tcctaaggac agcaaggatc 17460
ccctgtggct gggctgctct gtgatggctt ccgggaggag ggaggtggcc tgctgtagga 17520
aaatgctggg tggagaagag gagagaaggc tggagaggta ggaaggaact gaagtatctg 17580
aagtgacaag gtgggtgtct ggactcgtcg ggtccccttc catctccctg ctgcctccac 17640
atgccaaccc cactcgtgca ccctcatctt cctatctcct caccagggt ctctcccctc 17700
ccacctccag ctttccagaa ggcctccagc atagtctata agaaagaggg ggaacagggt 17760
gagttctcct tcccactcgc ctttacagtt gaaaagctga cgggcagtgg cgagctgtgg 17820
tggcaggcgg agagggttc ctctccaag tcttgatca ctttgacct gaagaacaag 17880
gaagtgtctg taaaacgggt taccaggac cctaagctcc agatgggcaa gaagctcccg 17940
ctccacctca ccctgcccc ggccttgctt cagtatgctg gctctggaaa cctcaccctg 18000
gcccttgaag cgaaaacagg aaagttgcat caggaagtga acctggtggt gatgagaggt 18060
gaggggcccag gccagggagg ggtgggcagg ggaaggagtt ggaggggcct ggcccagggc 18120
tcctctgag gcaagccagg cccaagagg ggatgcctag gccctggtca cctggatgaa 18180
gtgagggagg gccctctggg tttgggctg gttttgaact gagacatcca tgagccagcc 18240
tgggctggc ttcactgaag atc 18263

<210> 4
<211> 458
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

5

10

ES 2 736 052 T3

<400> 4

Met Cys Arg Ala Ile Ser Leu Arg Arg Leu Leu Leu Leu Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Leu Leu Ala Val Thr Gln Gly Lys Lys Val Val Leu Gly
 20 25 30

Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys
 35 40 45

Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly
 50 55 60

Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg
 65 70 75 80

Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile
 85 90 95

Ile Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile Cys Glu Val
 100 105 110

Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val Phe Gly Leu Thr Ala
 115 120 125

Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu
 130 135 140

Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg
 145 150 155 160

Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu Ser Val Ser Gln Leu Glu
 165 170 175

Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys
 180 185 190

Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala Phe Gln Lys Ala
 195 200 205

Ser Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu Gln Val Glu Phe Ser Phe
 210 215 220

Pro Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu Trp
 225 230 235 240

Trp Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys Ser Trp Ile Thr Phe Asp

ES 2 736 052 T3

				245						250						255
Leu	Lys	Asn	Lys	Glu	Val	Ser	Val	Lys	Arg	Val	Thr	Gln	Asp	Pro	Lys	
			260					265					270			
Leu	Gln	Met	Gly	Lys	Lys	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Thr	Leu	Pro	Gln	Ala	
		275					280						285			
Leu	Pro	Gln	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gly	Asn	Leu	Thr	Leu	Ala	Leu	Glu	Ala	
	290					295					300					
Lys	Thr	Gly	Lys	Leu	His	Gln	Glu	Val	Asn	Leu	Val	Val	Met	Arg	Val	
305					310					315					320	
Ala	Gln	Leu	Asn	Asn	Thr	Leu	Thr	Cys	Glu	Val	Met	Gly	Pro	Thr	Ser	
				325					330						335	
Pro	Lys	Met	Arg	Leu	Thr	Leu	Lys	Gln	Glu	Asn	Gln	Glu	Ala	Arg	Val	
			340					345					350			
Ser	Glu	Glu	Gln	Lys	Val	Val	Gln	Val	Val	Ala	Pro	Glu	Thr	Gly	Leu	
		355					360					365				
Trp	Gln	Cys	Leu	Leu	Ser	Glu	Gly	Asp	Lys	Val	Lys	Met	Asp	Ser	Arg	
	370					375						380				
Ile	Gln	Val	Leu	Ser	Arg	Gly	Val	Asn	Gln	Thr	Val	Phe	Leu	Ala	Cys	
385					390					395					400	
Val	Leu	Gly	Gly	Ser	Phe	Gly	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly	Leu	Cys	Ile	
				405					410					415		
Leu	Cys	Cys	Val	Arg	Cys	Arg	His	Gln	Gln	Arg	Gln	Ala	Ala	Arg	Met	
			420					425					430			
Ser	Gln	Ile	Lys	Arg	Leu	Leu	Ser	Glu	Lys	Lys	Thr	Cys	Gln	Cys	Pro	
		435					440					445				
His	Arg	Met	Gln	Lys	Ser	His	Asn	Leu	Ile							
	450					455										

<210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Sintético

	<400> 5 gaagtggtg tgccattcag a	21
5	<210> 6 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Sintético	
15	<400> 6 aaagctcaga agcagacaga gtca	24
20	<210> 7 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Sintético	
25	<400> 7 ttccaaaagc ctacagcagg cccag	25
30	<210> 8 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Sintético	
35	<400> 8 tcatctcccc ttcctgaacc t	21
40	<210> 9 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Sintético	
50	<400> 9 cccagccaca agaagaagaa a	21
55	<210> 10 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Sintético	
60	<400> 10 ctccccgc atccatttt ctgttc	26
65	<210> 11 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Sintético	

	<400> 11 ggtctcgaac tcatgagctc aa	22
5	<210> 12 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Sintético	
15	<400> 12 ggcatagtgga cacacacctg taatt	25
20	<210> 13 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Sintético	
25	<400> 13 tgatccactc acctggcct ctgagag	27
30	<210> 14 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Sintético	
35	<400> 14 gtcagggagc ttactttctt tggtg	25
40	<210> 15 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Sintético	
	<400> 15 tgtagtgtc cctgagtaag tggatt	26
50	<210> 16 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Sintético	
	<400> 16 ctcagctcca caccctacc aagttgg	27
60	<210> 17 <211> 142 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Sintético	

ES 2 736 052 T3

	<400> 17	
	tgtttgcctg tgacatgaac tcattgtgac acaaaccact gtgctagggg ggatccacta	60
	gtaacggccg ccagtgtgct ggaattcgcc ctcgcaaggg ccaggcatat aagtacacaa	120
	taaacaaatg gcagctctct cc	142
5	<210> 18 <211> 99 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Sintético	
15	<400> 18	
	cccctccttc cttccccagg cactttccaa gtgtcaactc tagagcctat cgcggccgca	60
	ccggtataac ttogtataat gtatgctata cgaagttat	99
20	<210> 19 <211> 90 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Sintético	
	<400> 19	
	ataacttctg ataatgtatg ctatacgaag ttatgtcgcac gtagcctatt tctctagatc	60
	caaatgatg acaacaaaag gtaccttctg	90
30	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Sintético	
40	<400> 20 gcagctctgc cctcattcag 20	
45	<210> 21 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Sintético	
	<400> 21 catctttgcc gtatggtgg t 21	
55	<210> 22 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	

<220>
 <223> Sintético

5 <400> 22
 ccccttcgctc cctgctggtt ca 22

<210> 23
 <211> 26
 10 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

15 <400> 23
 caagaagact accctgaaga tgaaga 26

<210> 24
 <211> 23
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

25 <400> 24
 tgtgagtgc acaatggaaa act 23

<210> 25
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 25
 40 cgttccccca cccagagacc ca 22

<210> 26
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 26
 50 ggcaccgagc agtgacagt 19

<210> 27
 <211> 22
 <212> ADN
 55 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 27
 60 ttcaccgtgg atagtcctt tt 22

<210> 28
 <211> 24
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

5 <400> 28
 agttcctggc cctctgggat tccg 24

<210> 29
 <211> 26
 10 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

15 <400> 29
 ttgctttctt tctgtagtg attcc 26

<210> 30
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

25 <400> 30
 ccggcacact ctcttctga g 21

<210> 31
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 31
 40 tcccaccact gccagccca 20

<210> 32
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 32
 50 tgcggccgat ctagcc 17

<210> 33
 <211> 18
 <212> ADN
 55 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 33
 60 ttgaccgatt ccttgagg 18

<210> 34
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 736 052 T3

<220>
 <223> Sintético

5 <400> 34
 acgagcgggt tcggccatt c 21

10 <210> 35
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Sintético
 <400> 35

tgaacctgct gctgctgggt gagtcgatta tcctggggag tggagaagct aggccgagcc 60

agttccgggt gtcgccgctg gatcggacct ggaacctggg 100

20 <210> 36
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Sintético
 <400> 36

atgccagggga cagccctgat actgtaggta gagtcaaggg ctgtccaagt accggtataa 60

cttcgtataa ggtatcctat acgaagttat 90

30 <210> 37
 <211> 89
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Sintético
 <400> 37

ataacttcgt ataaggtatc ctatacgaag ttatctcgac ctgatcttg aggagacct 60

ggaccgggag acgtgctggg ggcagggtt 89

40 <210> 38
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Sintético
 <400> 38

50 gatgctcttg gctctccag aa 22

55 <210> 39
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

ES 2 736 052 T3

<223> Sintético
 <400> 39
 atgaagccat atagacaacg aaggt 25
 5
 <210> 40
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 40
 ccagctccaa actccccag cc 22
 15
 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 41
 tcagccccag agaccagaag 20
 25
 <210> 42
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 42
 tcaatcgctt gagagcacct aa 22
 35
 <210> 43
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 43
 ttgtcggccc cgtggctca 19
 45
 <210> 44
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 44
 gcggttctcg ggcaaga 17
 55
 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 65

<223> Sintético
 <400> 45
 5 tcagggccga gcagaaatag 20
 <210> 46
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Sintético
 <400> 46
 15 acaccttcgt cctcacctg agcga 25
 <210> 47
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 25 <400> 47
 ggttcacctc aacctgtttt cc 22
 <210> 48
 <211> 18
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 35 <400> 48
 cgctccagg tgcgctaa 18
 <210> 49
 <211> 22
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 45 <400> 49
 acctgggcc tgcttcaag cc 22
 <210> 50
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Sintético
 <400> 50
 55 ggtggagagg ctattcggc 19
 <210> 51
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 65

ES 2 736 052 T3

<223> Sintético

<400> 51
gaacacggcg gcatcag 17

5

<210> 52
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<223> Sintético

<400> 52
tgggcacaac agacaatcgg ctg 23

15

<210> 53
<211> 210
<212> PRT
<213> Artificial

20

<220>
<223> Sintético

25

<400> 53

Met Gln Pro Trp Leu Trp Leu Val Phe Ser Met Lys Leu Ala Val Leu
1 5 10 15

His Gly Asn Ser Val Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln
20 25 30

Thr Asn Lys Met Val Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser
35 40 45

Asn Met Arg Ile Tyr Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp
50 55 60

Ser His His Glu Phe Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile
65 70 75 80

His Gly Glu Glu Val Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg Asp Ala
85 90 95

Ser Arg Phe Ile Leu Asn Leu Thr Ser Val Lys Pro Glu Asp Ser Gly
100 105 110

Ile Tyr Phe Cys Met Ile Val Gly Ser Pro Glu Leu Thr Phe Gly Lys
115 120 125

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

Thr Lys Lys Ser Thr Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro Arg Pro
145 150 155 160

ES 2 736 052 T3

Glu Thr Gln Lys Gly Leu Thr Cys Ser Leu Thr Thr Leu Ser Leu Leu
 165 170 175

Val Val Cys Ile Leu Leu Leu Leu Ala Phe Leu Gly Val Ala Val Tyr
 180 185 190

Phe Tyr Cys Val Arg Arg Arg Ala Arg Ile His Phe Met Lys Gln Phe
 195 200 205

His Lys
 210

<210> 54
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Sintético

10

<400> 54

Met Ala Ser Pro Leu Thr Arg Phe Leu Ser Leu Asn Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Gly Glu Ser Ile Ile Leu Gly Ser Gly Glu Ala Arg Pro Ser Gln Phe
 20 25 30

Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu
 35 40 45

Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly Cys Ser Trp
 50 55 60

Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg
 85 90 95

Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp
 100 105 110

Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn
 115 120 125

Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys
 130 135 140

ES 2 736 052 T3

Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile
145 150 155 160

Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala
165 170 175

Gly Gly Ala Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr
180 185 190

Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser Leu
195 200 205

Ile Ile Thr Leu Ile Cys Tyr His Arg Ser Arg Lys Arg Val Cys Lys
210 215 220

Cys Pro Arg Pro Leu Val Arg Gln Glu Gly Lys Pro Arg Pro Ser Glu
225 230 235 240

Lys Ile Val

5 <210> 55
<211> 151
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 55

tatggagtga aagcctttgg tgtctgagat ctggcttag ttaaactctg ggatcggcgc 60
gccgaattcc tgcagcccgg gctcgagata acttcgtata atgtatgcta tacgaagtta 120
tatgcatccg ggtaggggag gcgcttttcc c 151

15 <210> 56
<211> 151
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 56

agtattgttt tgccaagttc taattccatc agacctcgac ctgcagccct agataacttc 60
gtataatgta tgctatacga agttatccta ggccagaggg cttgggttga cagaaactca 120
gtggcattct tatccagagt ttctctacac c 151

30 <210> 57
<211> 293
<212> PRT
<213> humano

ES 2 736 052 T3

<400> 57

Lys Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn
 20 25 30

Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro
 35 40 45

Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln
 50 55 60

Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp
 65 70 75 80

Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu
 85 90 95

Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln
 100 105 110

Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val
 115 120 125

Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu
 130 135 140

Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr
 145 150 155 160

Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val
 165 170 175

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

Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr
 195 200 205

Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys
 210 215 220

Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg
 225 230 235 240

ES 2 736 052 T3

Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His
 245 250 255

Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu
 260 265 270

Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn
 275 280 285

Leu Val Val Met Arg
 290

5
 <210> 58
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 58

Val Leu His Gly Asn Ser Val Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys
 1 5 10 15

Val Gln Thr Asn Lys Met Val Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser
 20 25 30

Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser
 35 40 45

Ser Asp Ser His His Glu Phe Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly
 50 55 60

Thr Ile His Gly Glu Glu Val Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg
 65 70 75 80

Asp Ala Ser Arg Phe Ile Leu Asn Leu Thr Ser Val Lys Pro Glu Asp
 85 90 95

Ser Gly Ile Tyr Phe Cys Met Ile Val Gly Ser Pro Glu Leu Thr Phe
 100 105 110

Gly Lys Gly Thr Gln Leu Ser Val Val Asp Phe Leu Pro Thr Thr Ala
 115 120 125

Gln Pro Thr Lys Lys Ser Thr Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro
 130 135 140

Arg Pro Glu Thr Gln Lys Gly
 145 150

10
 <210> 59

ES 2 736 052 T3

<211> 152
 <212> PRT
 <213> humano

5 <400> 59

Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu
 1 5 10 15

Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr
 20 25 30

Ser Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser Pro
 35 40 45

Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly
 50 55 60

Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp Thr Phe Val
 65 70 75 80

Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val
 100 105 110

Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr
 115 120 125

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
 130 135 140

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala
 145 150

REIVINDICACIONES

1. Un roedor modificado genéticamente, que comprende

5 una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/roedor quimérico, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido MHC II α humanizado y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido MHC II β humanizado, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/roedor quimérico está presente en un locus co-receptor de CD4 de roedor endógeno y las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido MHC II α humanizado y un polipéptido MHC II β humanizado están presentes en un locus MHC II de roedor endógeno; en donde el roedor no expresa un co-receptor CD4 de roedor endógeno funcional desde su locus CD4 endógeno, en donde el roedor no expresa un polipéptido de MHC II α de roedor endógeno funcional desde el locus de MHC II endógeno, en donde el roedor no expresa un polipéptido de MHC II β de roedor endógeno funcional desde el locus de MHC II endógeno, en donde el polipéptido CD4 humano/roedor quimérico comprende al menos el dominio de unión a MHC II de un polipéptido CD4 humano y al menos los dominios transmembrana y citoplásmico de un polipéptido CD4 de roedor, en donde el polipéptido MHC II α humanizado comprende dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de un polipéptido MHC II α humano y dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido MHC II α de roedor, en donde el polipéptido MHC II β humanizado comprende dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ de un polipéptido MHC II β humano y dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido MHC II β de roedor, en donde el roedor expresa el polipéptido CD4 humano/roedor quimérico y una proteína MHC II humanizada que comprende los polipéptidos MHC II α humanizados y MHC II β humanizados y en donde el polipéptido CD4 humano/roedor quimérico y la proteína MHC II humanizada interactúan.

2. El roedor de la reivindicación 1, en donde el polipéptido CD4 humano/roedor quimérico no se expresa en células B o células T positivas únicas CD8.

3. Un roedor modificado genéticamente, que comprende

30 una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido CD8 α humano/roedor quimérico, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido CD8 β humano/roedor quimérico, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido MHC I humanizado y, opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de microglobulina $\beta 2$ humana o humanizada, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido CD8 α humano/roedor quimérico está presente en un locus de co-receptor CD8 α de roedor endógeno, la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido CD8 β humano/roedor quimérico está presente en un locus de co-receptor CD8 β de roedor endógeno, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido MHC I humanizado está presente en un locus MHC I de roedor endógeno y la secuencia de nucleótidos que codifica una microglobulina $\beta 2$ humana o humanizada, cuando está presente, está presente en un locus de microglobulina $\beta 2$ de roedor endógeno; en donde el roedor no expresa un co-receptor CD8 de roedor endógeno funcional desde el locus CD8 endógeno, un polipéptido MHC I de roedor endógeno funcional desde el locus MHC I endógeno, o una microglobulina $\beta 2$ de roedor endógeno funcional desde el locus de microglobulina $\beta 2$ de roedor endógeno cuando comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una microglobulina $\beta 2$ humana o humanizada; en donde el CD8 α humano/roedor quimérico comprende al menos un dominio de unión a MHC I de un polipéptido CD8 α humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD8 α de roedor, en donde el polipéptido CD8 β humano/roedor quimérico comprende al menos un dominio de unión a MHC I de un polipéptido CD8 β humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD8 β de roedor, en donde el polipéptido MHC I humanizado comprende los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un polipéptido MHC I humano y los dominios transmembrana y citoplásmico de un polipéptido MHC I de roedor, en donde el roedor expresa una proteína CD8 humana/roedor quimérica que comprende los polipéptidos CD8 α y CD8 β y el polipéptido MHC I humanizado y opcionalmente la microglobulina $\beta 2$ humana o humanizada y en donde interactúan la proteína CD8 humana/roedor quimérica y el polipéptido MHC I humanizado.

4. El roedor de la reivindicación 3, en donde la proteína CD8 humana/roedor quimérica no se expresa en células B o células T positivas únicas CD4.

5. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el roedor es un ratón.

6. El ratón de la reivindicación 5, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico está unida operativamente al promotor CD4 de ratón endógeno y a secuencias reguladoras, o en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido CD8 α humano/ratón quimérico está unida operativamente al promotor CD8 α de ratón y a secuencias reguladoras y la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido CD8 β humano/ratón quimérico está unida operativamente a un promotor CD8 β de ratón endógeno y a secuencias reguladoras.

7. El ratón de las reivindicaciones 5 o 6, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico o la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido CD8 α humano/ratón quimérico y la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido CD8 β humano/ratón quimérico están comprendidas en la línea germinal del ratón.
8. Un método para modificar un ratón para que exprese un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico que comprende reemplazar en un locus CD4 endógeno de un ratón una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 de ratón endógeno con una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico, en donde el polipéptido CD4 humano/ratón quimérico comprende al menos un dominio de unión a MHC II de un polipéptido CD4 humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD4 de ratón, en donde el ratón expresa (1) el polipéptido CD4 humano/ratón quimérico y (2) un MHC II humanizado que comprende (a) los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de un polipéptido MHC II α y los dominios transmembrana y citoplásmico del polipéptido MHC II α de ratón endógeno y (b) los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ de un polipéptido MHC II β humano y dominios transmembrana y citoplásmicos del polipéptido MHC II β de ratón endógeno y en donde el polipéptido CD4 humano/ratón quimérico y el MHC II humanizado interactúan.
9. Un método para modificar un ratón para que exprese un polipéptido CD8 humano/ratón quimérico que comprende (i) reemplazar en un locus CD8 α endógeno de un ratón una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 α de ratón endógeno con una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 α humano/ratón quimérico, en donde el polipéptido CD8 α humano/ratón quimérico comprende al menos un dominio de unión a MHC I de un polipéptido CD8 α humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD8 α de ratón; y (ii) reemplazar en un locus CD8 β endógeno de un ratón una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 β de ratón endógeno con una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 β humano/ratón quimérico, en donde el polipéptido CD8 β humano/ratón quimérico comprende al menos un dominio de unión a MHC I de un polipéptido CD8 β humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD8 β de ratón; en donde el ratón expresa una proteína CD8 humana/ratón quimérica que comprende los polipéptidos CD8 α y CD8 β y un polipéptido MHC I humanizado que comprende los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un polipéptido MHC I humano y dominios transmembrana y citoplásmico del polipéptido MHC I de ratón endógeno y en donde la proteína CD8 humana/ratón quimérica y el polipéptido MHC I humanizado interactúan.

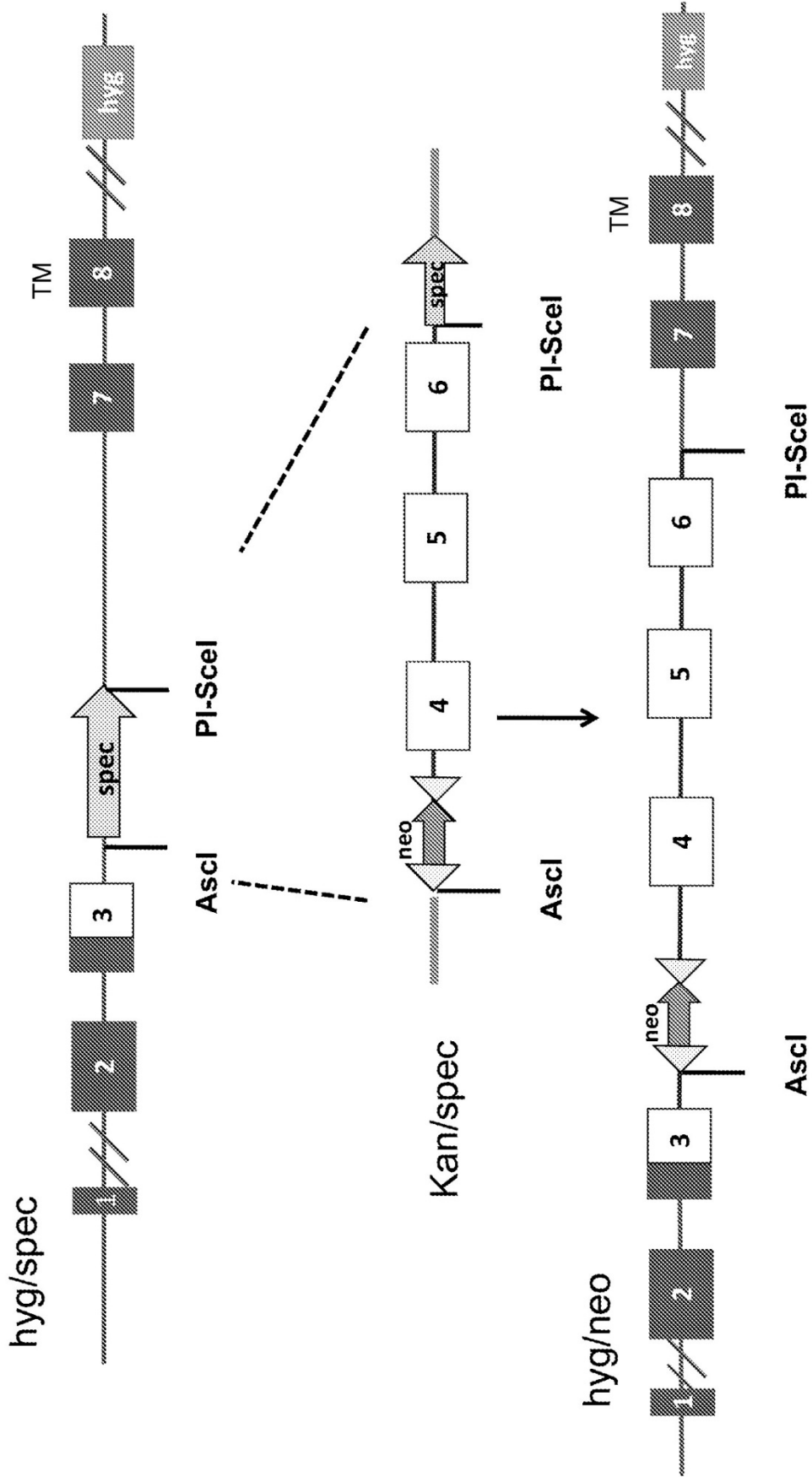


FIG. 1

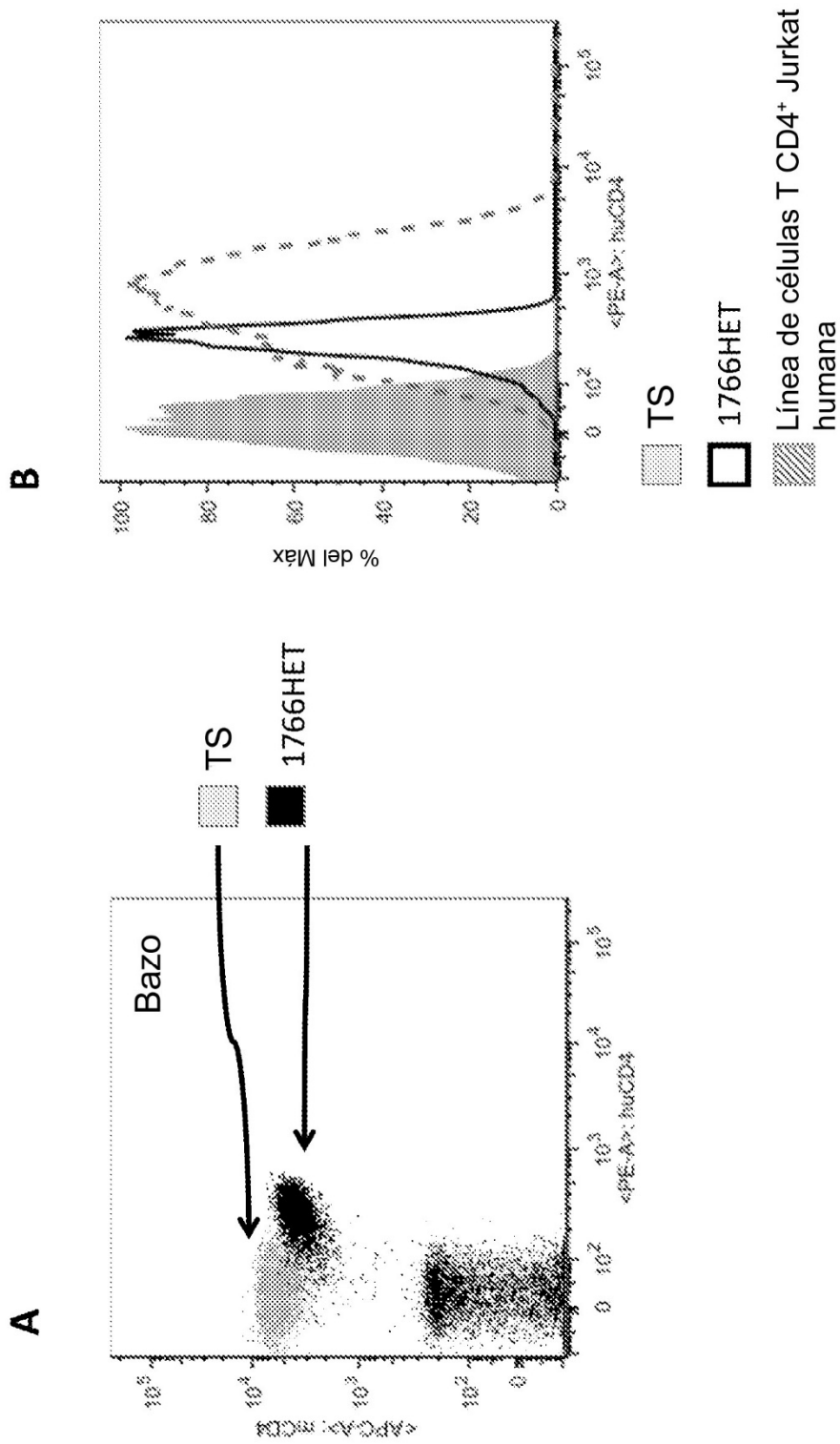


FIG. 2

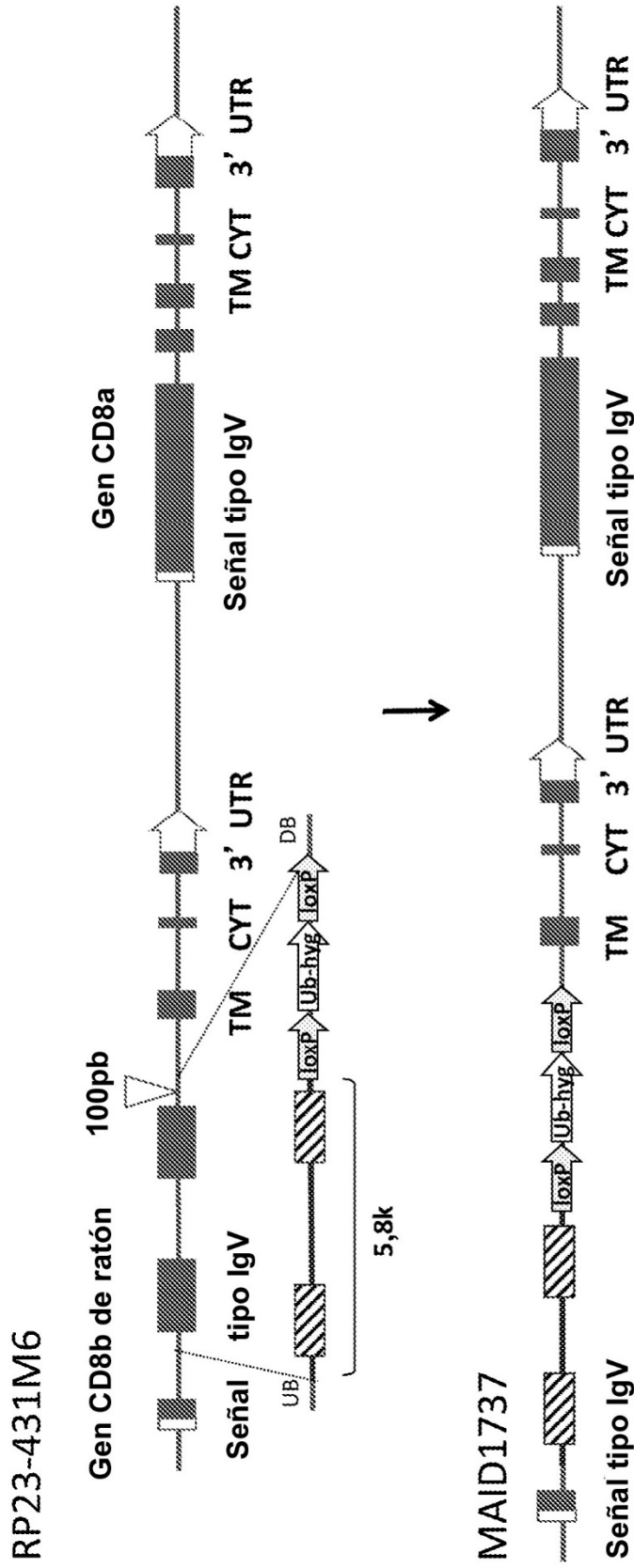


FIG. 3

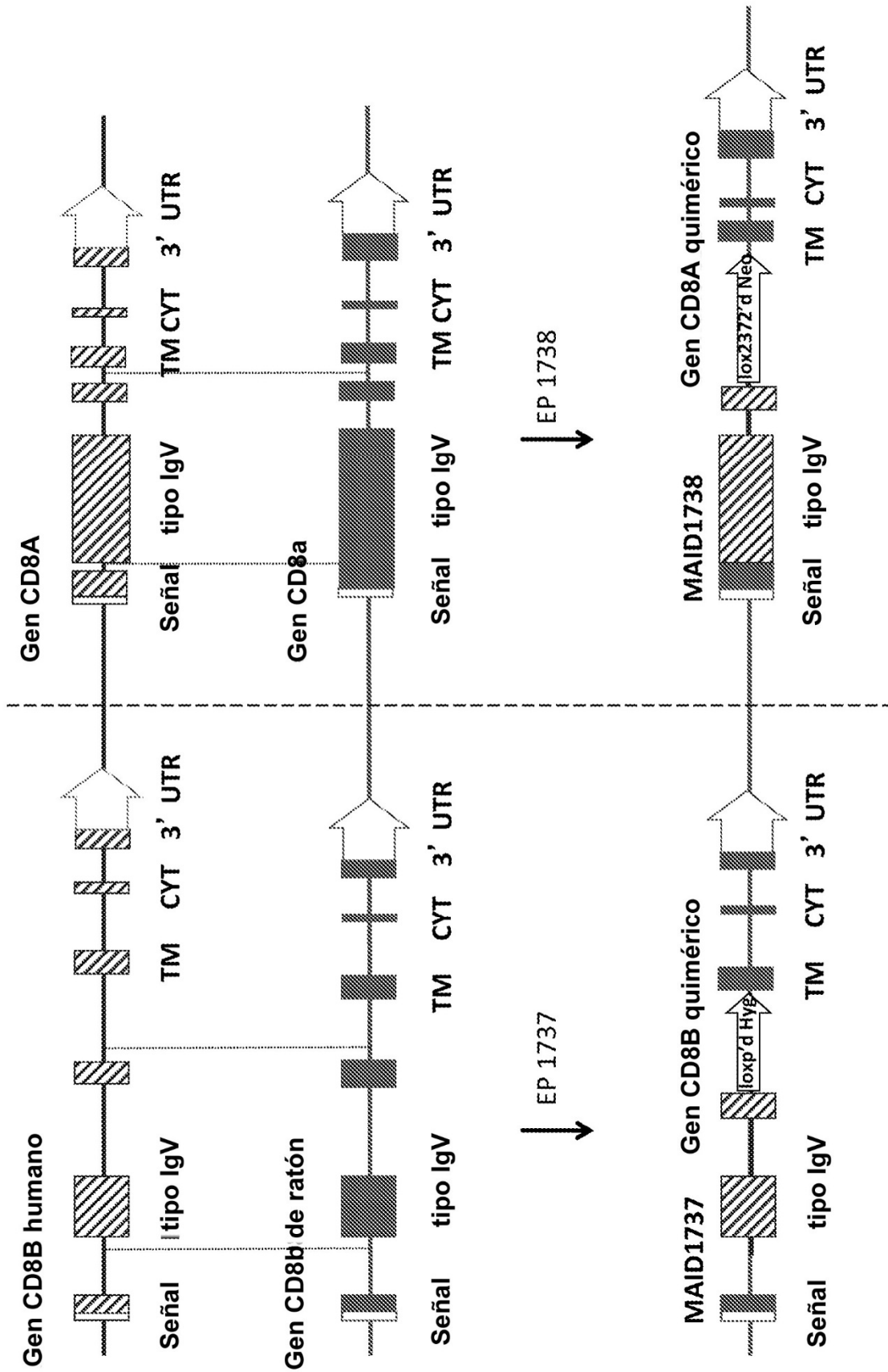


FIG. 5

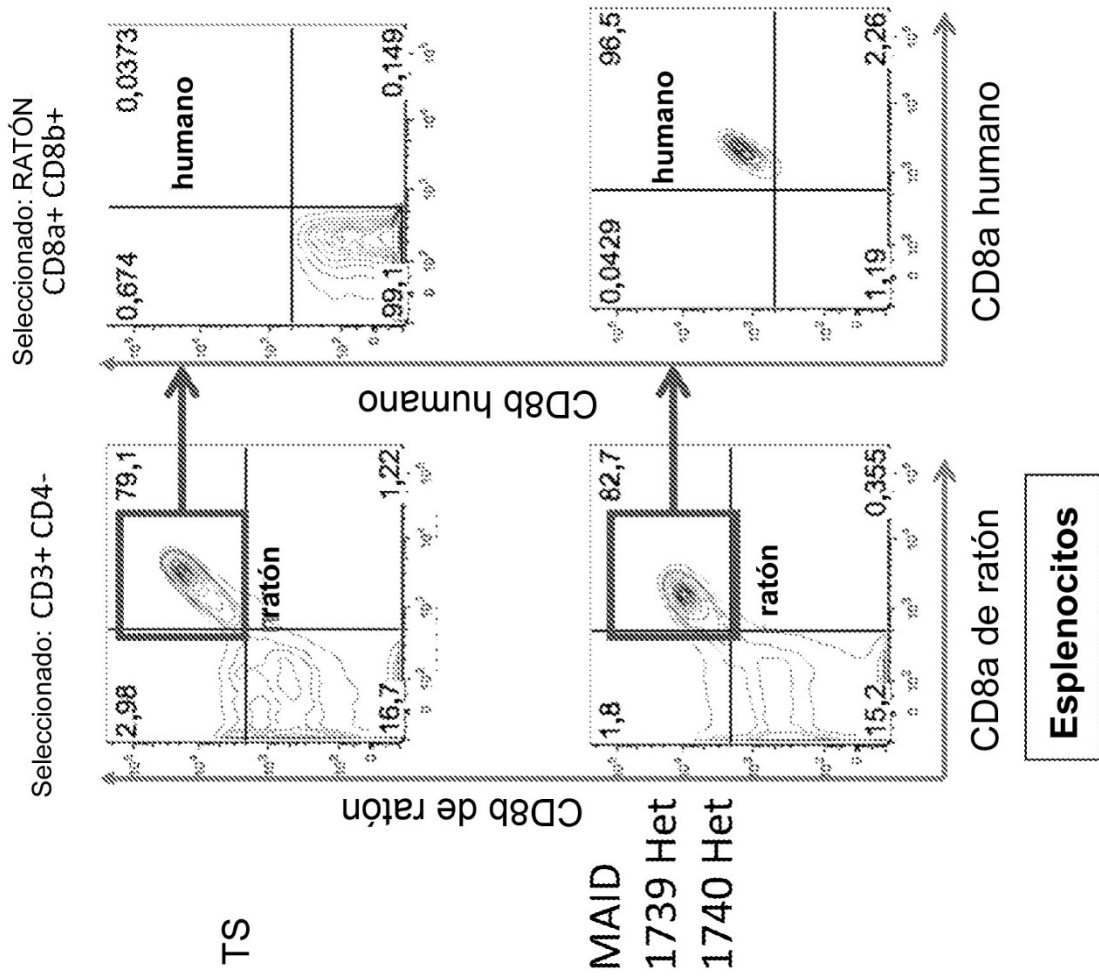


FIG. 6

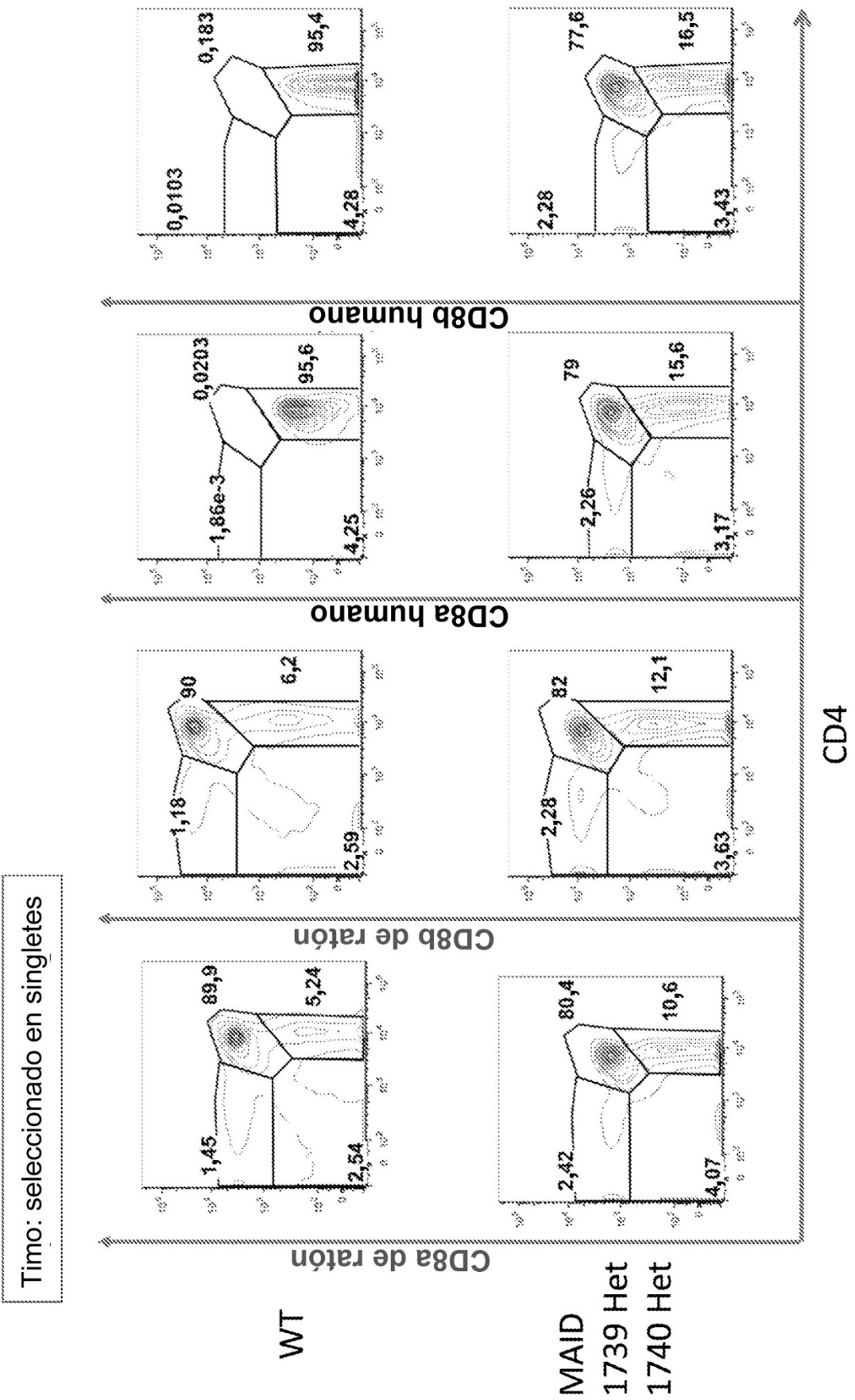


FIG. 7