(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 794 942**

(51) Int. CI.:

C07K 14/735 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2015 PCT/US2015/024920**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2015 WO15157415**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2015 E 15718060 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3129400**

(54) Título: **Animales no humanos que tienen receptores Fc-gamma humanizados**

(30) Prioridad:

08.04.2014 US 201461977037 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.11.2020

(73) Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591-6707, US

(72) Inventor/es:

MURPHY, ANDREW J.;
MACDONALD, LYNN;
GURER, CAGAN;
MEAGHER, KAROLINA A. y
TU, NAXIN

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

DESCRIPCIÓN

Animales no humanos que tienen receptores Fc-gamma humanizados

Antecedentes

Los receptores Fc (FcR, *Fc receptors*) son proteínas que se encuentran en la superficie de las células del sistema inmunitario y que llevan a cabo una variedad de funciones del sistema inmunitario de los mamíferos. Los FcR existen en una variedad de tipos, en una variedad de células y median una variedad de funciones inmunitarias tales como, por ejemplo, la unión a anticuerpos que están unidos a células infectadas o patógenos invasores, la estimulación de las células fagocíticas o citotóxicas para destruir microbios, o células infectadas por fagocitosis mediada por anticuerpos o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*).

La ADCC es un proceso mediante el que las células efectoras del sistema inmunitario lisan una célula diana unida por anticuerpos. Este proceso depende de la exposición previa a un antígeno o célula foráneos, generando una respuesta de anticuerpos. La ADCC puede ser mediada a través de células efectoras tales como, por ejemplo, los linfocitos citolíticos naturales (NK*, Natural Killer*), mediante la unión de FcR expresado en la superficie de la célula efectora a la parte Fc del anticuerpo que se une al antígeno o célula foráneos. La señalización del receptor FcγR1 de alta afinidad desempeña un papel importante en la regulación del sistema inmunitario y la función de las células efectoras.

El documento WO99/00010 se refiere a animales transgénicos que expresan receptores Fc humanos. Honeychurch *et al*., (2000) *Blood* 96(10): 3544-3552 se refiere a la eficacia terapéutica de los anticuerpos biespecíficos dirigidos por FcγRI/CD64 en el linfoma de linfocitos B.

Sumario de la invención

La presente invención engloba el reconocimiento de que es deseable modificar animales no humanos, tales como ratones, para expresar una proteína FcγRI híbrida que permita la experimentación sobre las respuestas efectoras inmunitarias humanas que no pueda realizarse en seres humanos.

La presente invención también engloba el reconocimiento de que es deseable reemplazar el gen FcγRI de ratón endógeno por un gen FcγRI humanizado (híbrido).

Por tanto, la presente invención proporciona un ratón que expresa, a partir de un gen FcγRI que comprende un promotor FcγRI y una secuencia reguladora, una proteína FcγRI que comprende:

una parte extracelular de una cadena α de FcγRI humano que comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano, un dominio EC3 humano o una combinación de los mismos; y

un dominio citoplasmático de una cadena α de FcγRI de ratón. En algunas realizaciones, una parte extracelular de una cadena α de FcγRI humano comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano y un dominio EC3 humano.

En algunas realizaciones, la parte extracelular de la cadena α de FcγRI humano que comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano y un dominio EC3 humano.

En algunas realizaciones, el dominio EC1 está codificado por un exón al menos un 90 % idéntico al exón 3 de SEQ ID NO: 3; el dominio EC2 está codificado por un exón al menos un 90 % idéntico al exón 4 de SEQ ID NO: 3; o el dominio EC3 está codificado por un exón al menos un 90 % idéntico al exón 5 de SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el ratón de la invención no expresa de manera detectable una cadena α de FcγRI de ratón de longitud completa. En una realización, la proteína FcγRI comprende además un dominio transmembrana de cadena α de FcγRI completo o parcial. En una realización, la proteína FcγRI comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena α de FcγRI al menos un 90 % idéntica a SEQ ID NO: 5. En una realización, la proteína FcγRI se expresa en monocitos, macrófagos, neutrófilos o células dendríticas, preferentemente, en donde la expresión de la proteína FcγRI aumenta tras la administración de factor estimulante de colonias de granulocitos murinos (mG-CSF, *Murine Granulocyte Colony Stimulating Factor*) al ratón.

La invención también proporciona un ratón que comprende un gen FcγRI que comprende un promotor FcγRI y una secuencia reguladora y al menos un exón de un gen FcγRI humano que codifica una parte extracelular de la proteína FcγRI humana unida operativamente a al menos un exón de un gen FcγRI de ratón que codifica un parte intracelular de una proteína FcγRI de ratón.

En algunas realizaciones de la invención, el exón del gen FcγRI humano se selecciona del grupo que consiste en los exones 3, 4 y 5. En algunas realizaciones, el ratón de la invención no expresa un gen FcγRI funcional de ratón.

En algunas realizaciones, el promotor FcγRI y la secuencia reguladora son un promotor FcγRI y una secuencia reguladora de ser humano. En otras realizaciones, el promotor FcγRI y la secuencia reguladora son un promotor FcγRI y una secuencia reguladora de ratón.

La invención también proporciona una célula madre embrionaria de ratón cuyo genoma comprende un gen FcγRI que comprende un promotor FcγRI y una secuencia reguladora, y que codifica una proteína FcγRI que comprende una parte extracelular de una cadena α de FcγRI humano que comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano, un dominio EC3 humano o una combinación de los mismos; y un dominio citoplasmático de una cadena α de FcγRI de ratón. En algunas realizaciones, el gen FcγRI comprende los exones 3, 4 y 5 de un gen FcγRI humano. En algunas realizaciones, el gen FcγRI comprende además una o más regiones 5' no traducidas humanas que flanquean al exón 1 humano. En algunas realizaciones, la célula comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena α de FcγRI al menos un 90 % idéntica a SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, el gen FcγRI comprende el exón 6 de un gen FcγRI de ratón. En algunas realizaciones, el gen FcγRI se encuentra en un locus de FcγRI endógeno.

La invención también proporciona un embrión de ratón generado a partir de la célula madre embrionaria de la invención.

La invención proporciona además un método de creación de un ratón que expresa, a partir de un gen FcγRI que comprende un promotor FcγRI y una secuencia reguladora, una proteína FcγRI que comprende una parte extracelular de una cadena α de FcγRI humano que comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano, un dominio EC3 humano, o una combinación de los mismos, y un dominio citoplasmático de una cadena α de FcγRI de ratón, comprendiendo el método las etapas de:

(a) obtener una célula madre embrionaria de ratón de la invención; y

(b) crear un ratón usando la célula embrionaria de (a).

En la invención, también se proporciona un método de creación de un ratón que comprende modificar genéticamente el ratón de modo que exprese, a partir de un gen FcγRI que comprende un promotor FcγRI y una secuencia reguladora, una proteína FcγRI que comprende una parte extracelular de una cadena α de FcγRI humano que comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano, un dominio EC3 humano, o una combinación de los mismos, y un dominio citoplasmático de una cadena α de FcγRI de ratón.

En algunas realizaciones, el ratón fabricado mediante los métodos de la invención se modifica genéticamente para que no exprese de forma detectable una cadena α de FcγRI de ratón de longitud completa. En algunas realizaciones, el ratón fabricado mediante los métodos de la invención se modifica genéticamente para que la proteína FcγRI comprenda además un dominio transmembrana de la cadena α de FcγRI de ratón completo o parcial. En algunas realizaciones, el ratón fabricado mediante los métodos de la invención se modifica genéticamente de manera que la proteína FcγRI comprenda una secuencia de aminoácidos de la cadena α de FcγRI al menos un 90 % idéntica a SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, el ratón fabricado mediante los métodos de la invención se modifica de manera que la proteína FcγRI se expresa en monocitos, macrófagos, neutrófilos o células dendríticas, preferentemente, en donde el ratón se modifica genéticamente de manera que la expresión de la proteína FcγRI se aumenta tras la administración del factor estimulante de colonias de granulocitos murinos (mG-CSF) al ratón.

En algunas realizaciones, el ratón fabricado mediante los métodos de la invención se modifica genéticamente de manera que el dominio EC1 esté codificado por un exón al menos un 90 % idéntico al exón 3 de SEQ ID NO: 3; el dominio EC2 está codificado por un exón al menos un 90 % idéntico al exón 4 de SEQ ID NO: 3; o el dominio EC3 está codificado por un exón al menos un 90 % idéntico al exón 5 de SEQ ID NO: 3.

La invención proporciona además un método de creación de un ratón que comprende modificar genéticamente el ratón para que comprenda, en su genoma, un gen FcγRI que comprenda el promotor FcγRI y la secuencia reguladora, y al menos un exón de un gen FcγRI humano que codifique una parte extracelular de la proteína FcγRI humana unida operativamente al menos a un exón de un gen FcγRI de ratón codificante de una parte intracelular de una proteína FcγRI de ratón. En algunas realizaciones, el ratón se modifica genéticamente de manera que el exón del gen FcγRI humano se selecciona del grupo que consiste en los exones 3, 4 y 5. En algunas realizaciones, el ratón no expresa un gen FcγRI funcional de ratón.

En una realización, el promotor FcγRI y la secuencia reguladora de los métodos de la invención son un promotor FcγRI y una secuencia reguladora de ser humano. En otras realizaciones, el promotor FcγRI y la secuencia reguladora de los métodos de la invención son un promotor FcγRI y una secuencia reguladora de ratón.

La divulgación también proporciona un ratón que expresa una proteína FcγRI que comprende una parte extracelular de una cadena α de FcγRI humano que comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano, un dominio EC3 humano, o una combinación de los mismos, y un dominio citoplasmático de una cadena α de FcγRI de ratón. En algunas realizaciones, una parte extracelular de una cadena α de FcγRI humano comprende un dominio EC1 humano,

un dominio EC2 humano y un dominio EC3 humano.

En algunos aspectos, el dominio EC1 está codificado por un exón al menos un 50 %, 70 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntico al exón 3 de SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, el dominio EC2 está codificado por un exón al menos un 50 %, 70 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntico al exón 4 de SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, el dominio EC3 está codificado por un exón al menos un 50 %, 70 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntico al exón 5 de SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un ratón que expresa una proteína FcγRI que comprende la parte extracelular de una cadena α de FcγRI humano y la parte intracelular de una cadena α de FcγRI de ratón, en donde el ratón no expresa de manera detectable una cadena α de FcγRI de ratón de longitud completa. La parte intracelular de una cadena α de FcγRI comprende un dominio citoplasmático de una cadena α de FcγRI de ratón. En algunos aspectos, un ratón expresa además una cadena α de FcγRI que comprende un dominio transmembrana de la cadena α de FcγRI de ratón completo o parcial.

En algunos aspectos, la invención proporciona un ratón que expresa una secuencia de aminoácidos de la cadena α de FcγRI al menos un 70 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la proteína FcγRI humana o híbrida se expresa de forma detectable en monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y/o combinaciones de las mismas.

En algunos aspectos, el nivel de proteína FcγRI humana se aumenta mediante la administración de factor estimulante de colonias de granulocitos murinos (mG-CSF). En algunos aspectos, el nivel de proteína FcγRI de ratón no aumenta en monocitos, neutrófilos ni células dendríticas mediante la administración de factor estimulante de colonias de granulocitos murinos (mG-CSF).

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un ratón que expresa un gen FcγRI que comprende uno o más exones de un gen FcγRI humano unido operativamente a uno o más exones de un gen FcγRI de ratón. En algunos aspectos, los exones de un gen FcγRI humano codifican una o más partes extracelulares de la proteína FcγRI humana. En algunos aspectos, los exones de un gen FcγRI de ratón codifican una o más partes intracelulares de una proteína FcγRI de ratón. En algunos aspectos, los exones de un FcγRI humano se seleccionan del grupo que consiste en los exones 3, 4, 5 y combinaciones de los mismos.

En algunos aspectos, una parte intracelular de un FcγRI de ratón está operativamente unida a una o más cascadas de señalización intracelular de ratón.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un ratón que expresa una proteína FcγRI que comprende una parte extracelular de una cadena α de FcγRI humana, que comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano, un dominio EC3 humano o una combinación de los mismos, en donde las células de la línea germinal del ratón carecen de un gen FcγRI funcional de ratón. En algunos aspectos, la divulgación proporciona un ratón que expresa dicha proteína FcγRI, en donde las células de la línea germinal del ratón carecen de cualquier gen FcγRI del ratón.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una célula madre embrionaria de ratón cuyo genoma comprende un gen FcγRI que codifica una proteína FcγRI que comprende:

una parte extracelular de una cadena α de FcγRI humano que comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano, un dominio EC3 humano o una combinación de los mismos; y

un dominio citoplasmático de una cadena α de FcγRI de ratón. En algunos aspectos, un gen FcγRI comprende los exones 3, 4 y 5 de un gen FcγRI humano. En algunos aspectos, un gen FcγRI comprende además una o más regiones 5' no traducidas humanas que flanquean el exón 1 humano. En algunos aspectos, una parte extracelular de una proteína FcγRI humana comprende uno o más de entre EC1, EC2 y EC3.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una célula madre embrionaria de ratón cuyo genoma comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena α de FcγRI al menos un 70 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a SEQ ID NO: 5.

En algunos aspectos, la célula madre embrionaria de ratón proporcionada comprende un gen FcγRI que comprende restos de aminoácidos del exón 6 de un gen FcγRI de ratón. Una parte intracelular de una proteína FcγRI de ratón comprende el dominio citoplasmático de una proteína FcγRI de ratón.

En algunos aspectos, la célula madre embrionaria de ratón proporcionada comprende parte de un gen FcγRI humano que codifica una parte extracelular de una cadena α de FcγRI humano que comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano, un dominio EC3 humano o una combinación de los mismos, en donde la parte del gen FcγRI humano se encuentra en un locus de FcγRI endógeno que aparece en un genoma de ratón tal como se encuentra en

la naturaleza.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un embrión de ratón generado a partir de un tallo embrionario según lo descrito en el presente documento.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona el uso de una célula madre embrionaria de ratón según lo descrito en el presente documento para la creación de un ratón transgénico.

La divulgación también proporciona un método de creación de un ratón que expresa una proteína FcγRI que comprende una parte extracelular de una cadena α de FcγRI humano que comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano, un dominio EC3 humano, o una combinación de los mismos, y un dominio citoplasmático de una cadena α de FcγRI de ratón, comprendiendo el método las etapas de:

(a) obtener una célula madre embrionaria de ratón de la invención; y

(b) crear un ratón usando la célula embrionaria de (a). En algunos aspectos, el método comprende las etapas de: (a) obtener una célula madre embrionaria de ratón; (b) reemplazar en la célula embrionaria un gen FcγRI de ratón endógeno con un fragmento genómico que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la parte de proteína FcγRI humana que tiene regiones extracelulares humanas; y (c) crear el ratón usando la célula embrionaria de (b).

También se desvela un fragmento genómico que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína FcγRI que comprende:

una parte extracelular de una cadena α de FcγRI humano que comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano, un dominio EC3 humano o una combinación de los mismos; y

un dominio citoplasmático de una cadena α de FcγRI de ratón.

Como se usan en la presente solicitud, la expresión "alrededor de" y el término "aproximadamente" se usan como equivalentes. Cualquier numeral usado en la presente solicitud con o sin alrededor de/aproximadamente pretende abarcar cualquier fluctuación normal apreciada por un experto habitual en la materia pertinente.

Otras características, objetos y ventajas de la presente invención son evidentes en la divulgación detallada que figura a continuación. Debería entenderse, sin embargo, que la descripción detallada, aunque indica realizaciones de la presente invención, se proporciona solamente a modo de ilustración, sin limitación. Distintos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos incluidos en el presente documento tienen fines ilustrativos y no limitantes.

La Figura 1 muestra el genotipado del alelo de FcγRI de ratón en ratones experimentales y controles de tipo natural.
La Figura 2 muestra el número relativo de copias del gen FcγRI humano en ratones experimentales y controles de tipo natural.
La Figura 3 muestra datos transformados para números de copias de genes basados en ratones Het (+/-) que tienen una copia del FcγRI humano y calibrados según ΔCt medio.
La Figura 4 muestra la expresión de receptores FcγRI en células de donantes de sangre humanos.
La Figura 5 muestra una ilustración esquemática (no a escala) de un gen FcγRI humano, un gen FcγRI de ratón y un gen FcγRI humanizado.
La Figura 6 muestra una ilustración esquemática (no a escala) de un proceso de preparación de un casete MAID 6074.
La Figura 7 muestra que los ratones que tienen un gen FcγRI humanizado presentan frecuencias celulares normales en bazo y sangre.
La Figura 8 muestra poblaciones de bazo mieloide en ratones que tienen un gen FcγRI humanizado.
La Figura 9 muestra una pérdida de expresión de FcγRI murino en macrófagos del bazo de ratones que tienen un gen FcγRI humanizado.
La Figura 10 muestra una ganancia de expresión de FcγRI humano en monocitos del bazo de ratones que tienen un gen FcγRI humanizado.
La Figura 11 muestra la estrategia de estimulación durante el análisis FACS de macrófagos purificados de la cavidad peritoneal de ratones que tienen genes FcγRI endógenos de ratón (MAID 6074 WT) y ratones homocigotos para un gen FcγRI humanizado (MAID 6074 HO).
La Figura 12 muestra la expresión de FcγRI humano y FcγRI de ratón en macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones que tienen genes FcγRI de ratón endógenos (MAID 6074 WT) y ratones homocigotos para un gen FcγRI humanizado (MAID 6074 HO).
La Figura 13 muestra la estrategia de estimulación durante el análisis FACS de macrófagos derivados de médula ósea de ratones que tienen genes FcγRI de ratón endógenos (MAID 6074 WT) y ratones homocigotos para un gen

FcγRI humanizado (MAID 6074 HO).
La Figura 14 muestra la expresión de FcγRI humano y FcγRI de ratón en macrófagos derivados de médula ósea de ratones que tienen genes FcγRI de ratón endógenos (MAID 6074 WT) y ratones homocigotos para un gen FcγRI humanizado (MAID 6074 HO).
La Figura 15 muestra la estrategia de estimulación durante el análisis FACS de macrófagos derivados de médula ósea de ratones que tienen genes FcγRI de ratón endógenos (Control 75/25) y ratones heterocigotos para un gen FcγRI humanizado (MAID 6074 HET).
La Figura 16 muestra la expresión de FcγRI humano y FcγRI de ratón en macrófagos derivados de médula ósea de ratones que tienen genes FcγRI de ratón endógenos (Control 75/25) y ratones heterocigotos para un gen FcγRI humanizado (MAID 6074 HET).
La Figura 17 muestra las poblaciones de sangre mieloide en ratones MAID 6074 HO en comparación con MAID 6074 WT 48 horas después del tratamiento con PBS.
La Figura 18 muestra poblaciones de sangre mieloide en ratones MAID 6074 HO en comparación con ratones MAID 6074 WT 48 horas después del tratamiento con mG-CSF.
La Figura 19 muestra la falta de expresión de FcγRI humano en la sangre de ratones MAID 6074 WT y ratones MAID 6074 HO 48 horas después del tratamiento con PBS.
La Figura 20 muestra la expresión de FcγRI humano en la sangre de ratones MAID 6074 HO en comparación con ratones MAID 6074 WT 48 horas después del tratamiento con mG-CSF.
La Figura 21 muestra la falta de expresión de FcγRI murino en la sangre de ratones MAID 6074 WT y MAID 6074 HO 48 horas después del tratamiento con PBS.
La Figura 22 muestra la expresión de FcγRI murino en la sangre de MAID 6074 WT en comparación con ratones MAID 6074 HO 48 horas después del tratamiento con mG-CSF.
La Figura 23 muestra poblaciones esplénicas mieloides en MAID 6074 HO en comparación con ratones MAID 6074 WT 48 horas después del tratamiento con PBS.
La Figura 24 muestra poblaciones mieloides esplénicas en ratones MAID 6074 HO en comparación con ratones MAID 6074 WT 48 horas después del tratamiento con mG-CSF.
La Figura 25 muestra una falta de expresión de FcγRI humano en monocitos esplénicos en ratones MAID 6074 HO y ratones 6074 WT 48 horas después del tratamiento con PBS.
La Figura 26 muestra la expresión de FcγRI humano en el bazo de ratones MAID 6074 HO en comparación con ratones MAID 6074 WT 48 horas después del tratamiento con mG-CSF.
La Figura 27 muestra la expresión murina de FcγRI en el bazo de ratones MAID 6074 WT en comparación con ratones MAID 6074 HO 48 horas después del tratamiento con PBS.
La Figura 28 muestra la expresión de FcγRI murino en el bazo de ratones MAID 6074 WT en comparación con ratones MAID 6074 HO 48 horas después del tratamiento con mG-CSF.
La Figura 29 muestra un sumario de la expresión de FcγRI humano en poblaciones celulares de ratones MAID 6074 WT y MAID 6074 HO después del tratamiento con PBS o mG-CSF.
La Figura 30 muestra la regulación positiva del ARNm de FcγRI humano inducida por mG-CSF en sangre y bazo de ratón MAID 6074 HO normalizada con respecto a mHPRT1.
La Figura 31 muestra la regulación positiva del ARNm de FcγRI humano inducida por mG-CSF en sangre y bazo de ratón MAID 6074 HO.
La Figura 32 representa un esquema y una estrategia ilustrativa para la humanización del FcγRI de ratón.

Definiciones

La presente invención no se limita a los métodos ni a las condiciones experimentales que se describen en particular, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento solo tiene el fin de describir aspectos particulares de la divulgación, y no pretende ser limitante, dado que el alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos y las expresiones que se usan en el presente documento incluyen los significados que los términos y las expresiones tienen en la técnica, salvo que se indique claramente lo contrario o sea claramente evidente a partir del contexto en el que se usa un término o una expresión. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente invención, a continuación, se describen métodos y materiales particulares.

El término "aproximadamente" tal como se aplica en el presente documento a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia indicado. En ciertos aspectos, el término "aproximadamente" o la expresión "alrededor de" se refieren a un intervalo de valores que se encuentran comprendidos en el 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos en cualquier dirección (superior o inferior) del valor de referencia indicado a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo en el contexto (excepto cuando dicho número exceda el 100 % de un posible valor).

La expresión "biológicamente activo", como se usa en el presente documento, se refiere a una característica de cualquier agente que tiene actividad en un sistema biológico, *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, en un organismo). Por ejemplo, un agente que, cuando está presente en un organismo, tiene un efecto biológico dentro de ese organismo, se considera que es biológicamente activo. En aspectos particulares, cuando una proteína o un polipéptido es

biológicamente activo, una parte de esa proteína o polipéptido que comparte al menos una actividad biológica de la proteína o del polipéptido se denomina normalmente parte "biológicamente activa".

El término "comparables", como se usa en el presente documento, se refiere a dos o más agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etc. que pueden no ser idénticos entre sí, pero que son lo suficientemente similares para permitir la comparación entre ellos, de modo que se puedan sacar conclusiones razonablemente en función de las diferencias o similitudes observadas. Los expertos en la materia entenderán, en el contexto, qué grado de identidad se requiere en cualquier circunstancia para dos o más de estos agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etc. para considerarse comparables.

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

El término "interrupción", como se usa en el presente documento, se refiere al resultado de una recombinación homóloga con una molécula de ADN (por ejemplo, con una secuencia homóloga endógena tal como un gen o locus genético). En algunos aspectos, una interrupción puede lograr o representar una inserción, una eliminación, una sustitución, un reemplazo, una mutación sin sentido o un cambio de fase de una o varias secuencias de ADN, o cualquier combinación de las mismas. Las inserciones pueden incluir la inserción de genes enteros o fragmentos de genes, por ejemplo, exones, que pueden ser de un origen diferente a la secuencia endógena. En algunos aspectos, una interrupción puede aumentar la expresión y/o actividad de un gen o un producto génico (por ejemplo, de una proteína codificada por un gen). En algunos aspectos, una interrupción puede disminuir la expresión y/o actividad de un gen o un producto génico. En algunos aspectos, una interrupción puede alterar la secuencia de un gen o un producto génico codificado (por ejemplo, una proteína codificada). En algunos aspectos, una interrupción puede truncar o fragmentar un gen o un producto génico codificado (por ejemplo, una proteína codificada). En algunos aspectos, una interrupción puede extender un gen o un producto génico codificado; en algunos de dichos aspectos, una interrupción puede lograr el ensamblaje de una proteína de fusión. En algunos aspectos, una interrupción puede afectar al nivel, pero no a la actividad de un gen o producto génico. En algunos aspectos, una interrupción puede afectar a la actividad, pero no al nivel de un gen o producto génico. En algunos aspectos, una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre el nivel de un gen o producto génico. En algunos aspectos, una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre la actividad de un gen o producto génico. En algunos aspectos, una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre el nivel o la actividad de un gen o producto génico.

La expresión "locus endógeno" o "gen endógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a un locus genético encontrado en un organismo principal o de referencia antes de la introducción de una alteración, una eliminación, un reemplazo, una alteración o una modificación según lo descrito en el presente documento. En algunos aspectos, el locus endógeno tiene una secuencia que se encuentra en la naturaleza. En algunos aspectos, el locus endógeno es de tipo natural. En algunos aspectos, el organismo de referencia es un organismo de tipo natural. En algunos aspectos, el organismo de referencia es un organismo modificado genéticamente. En algunos aspectos, el organismo de referencia es un organismo criado en laboratorio (ya sea de tipo natural o modificado).

La expresión "promotor endógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a un promotor que está asociado de manera natural, por ejemplo, en un organismo de tipo natural, con un gen endógeno.

La expresión "proteína FcγRI", como se usa en el presente documento, se refiere a un receptor Fc de inmunoglobulina de alta afinidad que comprende una cadena α que tiene tres dominios extracelulares, un dominio transmembrana y un dominio intracelular.

A modo de ilustración, en la Tabla 3, se proporcionan secuencias representativas de nucleótidos y aminoácidos de un gen FcγRIa de ratón y ser humano. Los expertos en la materia, al leer la presente divulgación, reconocerán que uno o más genes de receptor FcγRI endógenos de un genoma (o todos) pueden reemplazarse por uno o más genes de

FcγRI heterólogos (por ejemplo, variantes polimórficas, subtipos o mutantes, genes de otra especie, etc.).

Una "célula con expresión de FcγRI", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que expresa FcγRI. En algunos aspectos, una célula que expresa FcγRI expresa un receptor FcγRI en su superficie. En algunos aspectos, un receptor FcγRI se expresa en la superficie de la célula en una cantidad suficiente para mediar las interacciones de célula a célula a través de la proteína FcγRI expresada en la superficie de la célula. Los ejemplos de células que expresan FcγRI incluyen, linfocitos, células mieloides, macrófagos, neutrófilos y linfocitos citolíticos naturales (NK). Las células que expresan FcγRI regulan la interacción de las células inmunitarias para regular la respuesta inmunitaria a diversos antígenos o patógenos foráneos. En algunos aspectos, los ratones de la presente divulgación demuestran la regulación de las células inmunitarias a través de receptores FcγRI humanizados expresados en la superficie de una o más células del ratón.

El término "heterólogo", como se usa en el presente documento se refiere a un agente o una entidad de distinto origen. Por ejemplo, cuando se usa en referencia a un polipéptido, gen o producto génico, o presente en una célula o un organismo en particular, el término aclara que el polipéptido, gen o producto génico en cuestión 1) fue modificado artificialmente; 2) se introdujo en la célula u el organismo (o un precursor del mismo) artificialmente (por ejemplo, mediante modificación genética); y/o 3) no se produce de manera natural ni está presente en la célula o el organismo en cuestión (por ejemplo, el tipo de célula u tipo de organismo pertinente).

La expresión "célula hospedadora", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula en donde se ha introducido un ácido nucleico o una proteína heteróloga/o (por ejemplo, exógeno/a). Los expertos en la materia, al leer la presente divulgación, comprenderán que dichas expresiones no solo se refieren a la célula del sujeto en particular, sino que también se usan para referirse a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse determinadas mutaciones en generaciones posteriores debido a una mutación o a influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aun así se incluyen dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora", como se usa en el presente documento. En algunos aspectos, una célula hospedadora es o comprende una célula procariota o eucariota. En general, una célula hospedadora es cualquier célula que sea adecuada para recibir y/o producir un ácido nucleico o una proteína heterólogo/a, independientemente del Reino de la vida al que está designada la célula. Las células ilustrativas incluyen las de procariotas y eucariotas (unicelulares o multicelulares), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., etc.), células de micobacterias, células fúngicas, células de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etc.), células vegetales, células de insectos (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insecto infectadas con baculovirus, *Trichoplusia ni*, etc.), células animales no humanas, células humanas, o fusiones de células tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. En algunos aspectos, la célula es célula humana, de mono, de simio, de hámster, de rata o de ratón. En algunos aspectos, la célula es eucariota y se selecciona entre las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, CHO DXB-11, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), célula retiniana, Vero, CV1, renal (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (por ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral y una estirpe celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunos aspectos, la célula comprende uno o más genes víricos, por ejemplo, una célula retiniana que expresa un gen vírico (por ejemplo, una célula PER.C6™). En algunos aspectos, una célula hospedadora es o comprende una célula aislada. En algunos aspectos, una célula hospedadora es parte de un tejido. En algunos aspectos, una célula hospedadora es parte de un organismo.

La expresión "gen FcγRI humano", como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica una parte completamente humana, parte sustancialmente humana o parte humanizada de una proteína FcγRI dependiendo del contexto. En algunos aspectos, un gen "FcγRI humano" se refiere a un gen FcγRI humanizado en contraste con un gen FcγRI de ratón completo. En algunos aspectos, un gen FcγRI humano contiene una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones o mutaciones. En algunos aspectos, un gen FcγRI humano comprende FcγRIA (CD64A), FcγRIB (CD64B), FcγRIC (CD64C) o combinaciones de los mismos.

La expresión "proteína FcγRI humana" se refiere a una proteína codificada por un gen FcγRI completamente humano, sustancialmente humano o humanizado dependiendo del contexto. En algunos aspectos, una proteína "FcγRI humana" se refiere a una proteína FcγRI humanizada en contraste con una proteína FcγRI completamente de ratón. En algunos aspectos, una proteína FcγRI humana comprende una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones o mutaciones de aminoácidos. En algunos aspectos, una proteína FcγRI comprende FcγRIA (CD64A), FcγRIB (CD64B), FcγRIC (CD64C) o combinaciones de los mismos.

La expresión "gen FcγRI híbrido" o "proteína FcγRI híbrida" se refiere a un gen o a una proteína FcγRI que incluye una secuencia FcγRI de al menos dos especies diferentes de animales. En algunos aspectos, un gen FcγRI híbrido incluye una parte de una secuencia de ácido nucleico humano y una parte de una secuencia de ácido nucleico de ratón. En algunos aspectos, una proteína FcγRI híbrida incluye una parte de secuencia de aminoácidos humanos y una parte de una secuencia de aminoácidos de ratón.

El término "humanizado", se usa en el presente documento de acuerdo con su significado entendido en la técnica para referirse a ácidos nucleicos o proteínas cuyas estructuras (es decir, secuencias de nucleótidos o aminoácidos) incluyen

partes que se corresponden esencial o idénticamente con estructuras de un gen o una proteína en particular que se encuentra en la naturaleza en un animal no humano, y también incluyen partes que difieren de las encontradas en el gen o la proteína no humano/a pertinente en particular y, en cambio, corresponden más estrechamente con estructuras comparables encontradas en un gen o una proteína humano/a correspondiente. En algunos aspectos, un gen "humanizado" es aquel que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos sustancialmente como la de un polipéptido humano (por ejemplo, una proteína humana o una parte de la misma, por ejemplo, parte característica de la misma). Por proporcionar un solo ejemplo, en el caso de un receptor de membrana, un gen "humanizado" puede codificar un polipéptido que tenga una parte extracelular que tenga una secuencia de aminoácidos como la de una parte extracelular humana y la secuencia restante como la de un polipéptido no humano (por ejemplo, de ratón). En algunos aspectos, un gen humanizado comprende al menos una parte de una secuencia de ADN de un gen humano. En algunos aspectos, un gen humanizado comprende una secuencia de ADN completa de un gen humano. En algunos aspectos, una proteína humanizada comprende una secuencia que tiene una parte que aparece en una proteína humana. En algunos aspectos, una proteína humanizada comprende una secuencia completa de una proteína humana y se expresa a partir de un locus endógeno de un animal no humano que corresponde al homólogo u ortólogo del gen humano.

El término "identidad", como se usa en el presente documento en relación con una comparación de secuencias, se refiere a la identidad determinada por diversos algoritmos diferentes conocidos en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos. En algunos aspectos, se determinan las identidades, como se describe en el presente documento, usando una alineación ClustalW v. 1.83 (lenta) que emplea una penalización por apertura de hueco de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,1, y que usa una matriz de similitud de Gonnet (MACVECTOR™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008).

Las expresiones "cascada de señalización intracelular" o "transducción de señal intracelular", como se usan en el presente documento, se refieren a una transmisión de señal desde una superficie celular a una o más dianas intracelulares. En algunos aspectos, la transducción de señal intracelular comprende una respuesta fisiológica en una célula que se produce mediante la unión de una molécula diana (por ejemplo, una región Fc de inmunoglobulina) a un componente extracelular de un receptor FcγR1.

El término "aislado/a", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia y/o entidad (1) que se ha separado de al menos algunos de los componentes a los que estaba asociada cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza y/o en un entorno experimental), y/o (2) que se ha diseñado, producido, preparado y/o fabricado artificialmente. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden haberse separado de aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o más de aproximadamente el 99 % de los otros componentes con los que estaban asociadas inicialmente. En algunos aspectos, los agentes aislados son aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o más de aproximadamente el 99 % puros. Como se usa en el presente documento, una sustancia es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes. En algunos aspectos, como entenderán aquellos expertos en la materia, una sustancia se puede seguir considerando "aislada" o incluso "pura", tras haberse combinado con otros ciertos componentes tales como, por ejemplo, uno o más vehículos o excipientes (por ejemplo, tampón, disolvente, agua, etc.); en dichos aspectos, el porcentaje de aislamiento o de pureza de la sustancia se calcula sin incluir dichos vehículos o excipientes. Por proporcionar un solo ejemplo, en algunos aspectos, un polímero biológico tal como un polipéptido o polinucleótido que se produce en la naturaleza se considera "aislado" cuando, a) en virtud de su origen o fuente de derivación no está asociado con algunos o todos los componentes que lo acompañan en su estado natural en la naturaleza; b) está sustancialmente libre de otros polipéptidos o ácidos nucleicos de la misma especie que la especie que lo produce en la naturaleza; c) se expresa o está asociado con componentes de una célula u otro sistema de expresión que no es de la especie que lo produce en la naturaleza. Por tanto, por ejemplo, en algunos aspectos, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente del que lo produce en la naturaleza se considera un polipéptido "aislado". Como alternativa o de modo adicional, en algunos aspectos, un polipéptido que ha sido sometido a una o más técnicas de purificación puede considerarse un polipéptido "aislado" en la medida en que se ha separado de otros componentes a) con los que está asociado en la naturaleza; y/o b) con los que estaba asociado cuando se produjo inicialmente.

La expresión "gen FcγRI de ratón", como se usa en el presente documento, se refiere a un gen que comprende una molécula nucleica tal como se muestra en SEQ ID NO: 1 o una molécula de ácido nucleico que tiene identidad sustancial con una molécula tal como se muestra en SEQ ID NO: 1.

La expresión "proteína FcγRI de ratón", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 2, incluyendo una proteína que tiene identidad sustancial con una proteína tal como se muestra en SEQ ID NO: 2.

La expresión "animal no humano", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier organismo vertebrado que no sea humano. En algunos aspectos, un animal no humano es un ciclostoma, un pez óseo, un pez cartilaginoso (por ejemplo, un tiburón o una raya), un anfibio, un reptil, un mamífero y un pájaro. En algunos aspectos, un mamífero no humano es un primate, una cabra, una oveja, un cerdo, un perro, una vaca o un roedor. El animal no humano empleado en la invención es un ratón.

La expresión "ácido nucleico", como se usa en el presente documento en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que se incorpora o puede incorporarse en una cadena oligonucleotídica. En algunos aspectos, un ácido nucleico es un compuesto y/o una sustancia que se incorpora o puede incorporarse en una cadena oligonucleotídica a través de un enlace fosfodiéster. Como quedará claro por el contexto, en algunos aspectos, "ácido nucleico" se refiere a restos de ácido nucleico individuales (por ejemplo, nucleótidos y/o nucleósidos); en algunos aspectos, "ácido nucleico" se refiere a una cadena oligonucleotídica que comprende restos de ácido nucleico individuales. En algunos aspectos, un "ácido nucleico" es o comprende ARN; en algunos aspectos, un "ácido nucleico" es o comprende ADN. En algunos aspectos, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más restos de ácido nucleico naturales. En algunos aspectos, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más análogos de ácido nucleico. En algunos aspectos, un análogo de ácido nucleico difiere de un ácido nucleico en que no utiliza una cadena principal de fosfodiéster. Por ejemplo, en algunos aspectos, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más "ácidos nucleicos peptídicos", que son conocidos en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en la cadena principal, que se consideran dentro del alcance de la presente divulgación. Como alternativa o de modo adicional, en algunos aspectos, un ácido nucleico tiene uno o más enlaces de fosforotioato y/o 5'-*N*-fosforamidita en lugar de enlaces fosfodiéster. En algunos aspectos, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina). En algunos aspectos, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más análogos de nucleósidos (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metil adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinil-citidina, C-5 propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-desazaadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina, 2-tiocitidina, bases metiladas, bases intercaladas y sus combinaciones). En algunos aspectos, un ácido nucleico comprende uno o más azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororibosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa) en comparación con los de los ácidos nucleicos naturales. En algunos aspectos, un ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico funcional tal como un ARN o una proteína. En algunos aspectos, un ácido nucleico incluye uno o más intrones. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos se preparan mediante uno o más de entre el aislamiento de una fuente natural, la síntesis enzimática por polimerización basada en una plantilla complementaria (*in vivo* o *in vitro*), la reproducción en una célula o sistema recombinante y la síntesis química. En algunos aspectos, un ácido nucleico es de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 20, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 o más restos de longitud. En algunos aspectos, un ácido nucleico es monocatenario; en algunos aspectos, un ácido nucleico es bicatenario. En algunos aspectos, un ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un elemento que codifica, o es el complemento de una secuencia que codifica, un polipéptido. En algunos aspectos, un ácido nucleico tiene actividad enzimática.

La expresión "unido/a operativamente", como se usa en el presente documento, se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia de control "unida operativamente" a una secuencia codificante está enlazada de manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias "unidas operativamente" incluyen las secuencias de control de la expresión que son contiguas con el gen de interés y las secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a distancia para controlar el gen de interés. La expresión "secuencia de control de la expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están ligadas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias apropiadas de inicio, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción; señales de procesamiento del ARN eficaces tales como señales de corte y empalme y señales de poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficacia de la traducción (es decir, secuencia consenso Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desea, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedador. Por ejemplo, en procariotas, dichas secuencias de control incluyen, en general, un promotor, un sitio de unión ribosomal y una secuencia de terminación de la transcripción, mientras que, en eucariotas, normalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de la transcripción. La expresión "secuencias de control" pretende incluir componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de parejas de fusión.

El término "polipéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. En algunos aspectos, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que se da en la naturaleza. En algunos aspectos, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que no se da en la naturaleza. En algunos aspectos, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que se modifica para diseñarse y/o producirse

artificialmente.

El término "recombinante", como se usa en el presente documento, pretende referirse a polipéptidos (por ejemplo, proteínas reguladoras de señal según lo descrito en el presente documento) que están diseñados, modificados, preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como polipéptidos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora, polipéptidos aislados de un banco combinatorio de polipéptidos humanos, recombinante, (Hoogenboom H. R., (1997) *TIB Tech*. 15:62-70; Azzazy H. y Highsmith W. E., (2002) *Clin. Biochem*. 35:425-445; Gavilondo J. V. y Larrick J. W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145; Hoogenboom H. y Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371-378), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humanos (véase, por ejemplo, Taylor, L. D., *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res*. 20:6287-6295; Kellermann S-A. y Green L. L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13:593-597; Little M. *et al* (2000) *Immunology Today* 21:364-370) o polipéptidos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de elementos de secuencia seleccionados entre sí. En algunos aspectos, uno o más de dichos elementos de secuencia seleccionados se encuentran en la naturaleza. En algunos aspectos, uno o más de dichos elementos de secuencia seleccionados se diseñan en silicio. En algunos aspectos, uno o más de dichos elementos de secuencia seleccionados proceden de la mutagénesis (por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*) de un elemento de secuencia conocido, por ejemplo, de una fuente natural o sintética. Por ejemplo, en algunos aspectos, un polipéptido recombinante se compone de secuencias encontradas en el genoma de un organismo fuente de interés (por ejemplo, ser humano, ratón, etc.). En algunos aspectos, un polipéptido recombinante tiene una secuencia de aminoácidos procedente de la mutagénesis (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, en un animal no humano), de modo que las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos recombinantes son secuencias que, aunque proceden de y están relacionadas con secuencias de polipéptidos, pueden no existir de manera natural dentro del genoma de un animal no humano *in vivo*.

El término "reemplazo" se usa en el presente documento para referirse a un proceso a través del cual una secuencia de ácido nucleico "reemplazada" (por ejemplo, un gen) que se encuentra en un locus del hospedador (por ejemplo, en un genoma) se elimina de ese locus y se ubica un ácido nucleico de "reemplazo" diferente en su lugar. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico reemplazada y las secuencias de ácido nucleico de reemplazo son comparables entre sí, en tanto en cuanto, por ejemplo, son homólogas entre sí y/o contienen elementos correspondientes (por ejemplo, elementos codificantes de proteínas, elementos reguladores, etc.). En algunos aspectos, una secuencia de ácido nucleico reemplazada incluye uno o más de entre un promotor, un potenciador, un sitio donante de corte y empalme, un sitio receptor de corte y empalme, un intrón, un exón, una región no traducida (UTR, *UnTranslated Region*); en algunos aspectos, una secuencia de ácido nucleico de reemplazo incluye una o más secuencias de codificación. En algunos aspectos, una secuencia de ácido nucleico de reemplazo es un homólogo de la secuencia de ácido nucleico reemplazada. En algunos aspectos, una secuencia de ácido nucleico de reemplazo es un ortólogo de la secuencia reemplazada. En algunos aspectos, una secuencia de ácido nucleico de reemplazo es o comprende una secuencia de ácido nucleico humana. En algunos aspectos, incluyendo donde la secuencia de ácido nucleico de reemplazo es o comprende una secuencia de ácido nucleico humana, la secuencia de ácido nucleico reemplazada es o comprende una secuencia de roedor (por ejemplo, una secuencia de ratón). La secuencia de ácido nucleico así colocada puede incluir una o más secuencias reguladoras que son parte de la secuencia de ácido nucleico fuente usada para obtener la secuencia así colocada (por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones 5' o 3' no traducidas, etc.). Por ejemplo, en distintos aspectos, el reemplazo es una sustitución de una secuencia endógena con una secuencia heteróloga que da lugar a la producción de un producto génico a partir de la secuencia de ácido nucleico así colocada (que comprende la secuencia heteróloga), pero no la expresión de la secuencia endógena; el reemplazo es de una secuencia genómica endógena con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene una función similar a una proteína codificada por la secuencia endógena (por ejemplo, la secuencia genómica endógena codifica una proteína FcγRI, y el fragmento de ADN codifica una o más proteínas FcγRI humanas). En distintos aspectos, un gen endógeno o fragmento del mismo se reemplaza con un gen humano correspondiente o fragmento del mismo. Un gen humano correspondiente o fragmento del mismo es un gen o fragmento humano que es un ortólogo de, o es sustancialmente similar o igual en estructura y/o función, que el gen no humano endógeno o fragmento del mismo que se reemplaza.

El término "sustancialmente", como se usa en el presente documento, se refiere a la condición cualitativa de presentar la extensión o el grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto habitual en las técnicas biológicas comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, o nunca, llegan a completarse y/o transcurren hasta completarse, o consiguen o evitan un resultado absoluto. Por tanto, el término "sustancialmente" se usa en el presente documento para capturar la posible falta de completitud inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos.

La expresión "homología sustancial", como se usa en el presente documento se refiere a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico. Como apreciarán los expertos habituales en la materia, en general, se considera que dos secuencias son "sustancialmente homólogas" si contienen restos homólogos en las posiciones correspondientes. Los restos homólogos pueden ser restos idénticos. Como alternativa, los restos homólogos pueden ser restos no idénticos con características estructurales y/o funcionales similares. Por ejemplo, Como es bien sabido por los expertos en la materia, ciertos aminoácidos normalmente se clasifican como aminoácidos "hidrófobos" o "hidrófilos", y/o como aquellos que tienen cadenas laterales "polares" o "no polares". La sustitución de un aminoácido

por otro del mismo tipo a menudo puede considerarse una sustitución "homóloga". Las clasificaciones de aminoácidos típicas se resumen en las Tablas 1 y 2.

TABLA 1

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

TABLA 2

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

Como es bien sabido en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos se pueden comparar usando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluidos los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST con huecos, y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Dichos programas ilustrativos se describen en Altschul, *et al*., "Basic local alignment search tool", *J. Mol. Biol*., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, *et al*., *Methods in Enzymology;* Altschul, *et al*., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res*. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, *et al*., "Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins", Wiley, 1998; y Misener, *et al*., (eds.), "Bioinformatics Methods and Protocols" (*Methods in Molecular Biology*, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias homólogas, los programas mencionados anteriormente normalmente proporcionan una indicación del grado de homología. En algunos aspectos, dos secuencias se consideran sustancialmente homólogas si al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus restos correspondientes son homólogos en un determinado tramo de restos. En algunos aspectos, el tramo pertinente es una secuencia completa. En algunos aspectos, el tramo pertinente es de al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o más restos. En algunos aspectos, el tramo pertinente incluye restos contiguos a lo largo de una secuencia completa. En algunos aspectos, el tramo pertinente incluye restos discontinuos a lo largo de una secuencia completa. En algunos aspectos, el tramo pertinente es de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más restos.

La expresión "identidad sustancial", como se usa en el presente documento se refiere a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico. Como apreciarán los expertos habituales en la materia, en general, se considera que dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si contienen restos idénticos en las posiciones correspondientes. Como es bien sabido en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos se pueden comparar usando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluidos los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST con huecos, y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Dichos programas ilustrativos se describen en Altschul, *et al*., "Basic local alignment search tool", *J. Mol. Biol*., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, *et al*., *Methods in Enzymology*; Altschul *et al*., *Nucleic Acids Res*. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis *et al*., "Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins", Wiley, 1998; y Misener, *et al*., (eds.), "Bioinformatics Methods and Protocols" (*Methods in Molecular Biology*, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente normalmente proporcionan una indicación del grado de identidad. En algunos aspectos, dos secuencias se consideran

sustancialmente idénticas si al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus restos correspondientes son idénticos en un determinado tramo de restos. En algunos aspectos, el tramo pertinente es una secuencia completa. En algunos aspectos, el tramo pertinente es de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más restos.

La expresión "vector de localización específica" o "construcción de localización específica", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula polinucleotídica que comprende una región de localización específica. Una región de localización específica comprende una secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia de una célula diana, tejido o animal y proporciona la integración de la construcción de localización específica en una posición dentro del genoma de la célula, tejido o animal por recombinación homóloga. También se incluyen las regiones de localización específica que se dirigen usando sitios de reconocimiento de recombinasa específicos del sitio (por ejemplo, sitios *loxP* o Frt). En algunos aspectos, una construcción de localización específica de la presente divulgación comprende además una secuencia de ácido nucleico o un gen de particular interés, un marcador seleccionable, secuencias de control y/o reguladoras, y otras secuencias de ácido nucleico que permiten la recombinación mediada a través de la adición exógena de proteínas que ayudan o facilitan la recombinación en la que participan dichas secuencias. En algunos aspectos, una construcción de localización específica de la presente divulgación comprende además un gen de interés en su totalidad o en parte, en donde el gen de interés es un gen heterólogo que codifica una proteína en su totalidad o en parte que tiene una función similar a una proteína codificada por una secuencia endógena.

El término "variante", como se usa en el presente documento, se refiere a una entidad que muestra una identidad estructural significativa con una entidad de referencia, pero difiere estructuralmente de la entidad de referencia en presencia o nivel de una o más fracciones químicas en comparación con la entidad de referencia. En muchos aspectos, una variante también difiere funcionalmente de su entidad de referencia. En general, el hecho de que una determinada entidad se considere adecuadamente una "variante" de una entidad de referencia se basa en su grado de identidad estructural con la entidad de referencia. Como apreciarán los expertos en la materia, cualquier entidad de referencia biológica o química tiene ciertos elementos estructurales característicos. Una variante, por definición, es una entidad química distinta que comparte uno o más de estos elementos estructurales característicos. Por proporcionar unos cuantos ejemplos, una molécula pequeña puede tener un elemento estructural central característico (por ejemplo, un núcleo macrocíclico) y/o una o más fracciones colgantes características, de modo que una variante de la molécula pequeña es aquella que comparte el elemento estructural central y las fracciones colgantes características, pero difiere en otras fracciones pendientes y/o en tipos de enlaces presentes (simple frente a doble, E frente a Z, etc.) dentro del núcleo, un polipéptido puede tener un elemento de secuencia característico compuesto por una pluralidad de aminoácidos que tengan posiciones designadas entre sí en un espacio lineal o tridimensional y/o que contribuyan a una determinada función biológica, un ácido nucleico puede tener un elemento de secuencia característico compuesto por una pluralidad de restos de nucleótidos que tengan posiciones designadas entre sí en un espacio lineal o tridimensional. Por ejemplo, una variante de polipéptido puede diferir de un polipéptido de referencia como resultado de una o más diferencias en la secuencia de aminoácidos y/o una o más diferencias en las fracciones químicas (por ejemplo, hidratos de carbono, lípidos, etc.) unidas covalentemente a la cadena principal del polipéptido. En algunos aspectos, una variante de polipéptido muestra una identidad de secuencia global con un polipéptido de referencia que es de al menos el 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % o 99 %. Como alternativa o de modo adicional, en algunos aspectos, una variante de polipéptido no comparte al menos un elemento de secuencia característico con un polipéptido de referencia. En algunos aspectos, el polipéptido de referencia tiene una o más actividades biológicas. En algunos aspectos, una variante de polipéptido comparte una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. En algunos aspectos, una variante de polipéptido carece de una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. En algunos aspectos, una variante de polipéptido muestra un nivel reducido de una o más actividades biológicas en comparación con el polipéptido de referencia. En muchos aspectos, se considera que un polipéptido de interés es una "variante" de un polipéptido precursor o de referencia si el polipéptido de interés tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la del precursor, pero para un pequeño número de alteraciones de secuencia en determinadas posiciones. Por lo general, menos del 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % de los restos de la variante están sustituidos en comparación con el precursor. En algunos aspectos, una variante tiene 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 restos sustituidos en comparación con un precursor. Con frecuencia, una variante tiene un número muy pequeño (por ejemplo, inferior a 5, 4, 3, 2 o 1) de restos funcionales sustituidos (es decir, restos que participan en una determinada actividad biológica). Asimismo, una variante normalmente no tiene más de 5, 4, 3, 2 o 1 adiciones o eliminaciones, y no suele tener adiciones ni eliminaciones, en comparación con el precursor. Además, cualquier adición o eliminación suele ser inferior a aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 19, aproximadamente 18, aproximadamente 17, aproximadamente 16, aproximadamente 15, aproximadamente 14, aproximadamente 13, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6 y, comúnmente, son inferiores a aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3 o aproximadamente 2 restos. En algunos aspectos, el polipéptido precursor o de referencia es aquel que se encuentra en la naturaleza. Como comprenderán los expertos habituales en la materia, comúnmente, se puede encontrar una pluralidad de variantes de un determinado polipéptido de interés en la naturaleza, particularmente cuando el polipéptido de interés es un agente polipeptídico infeccioso.

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está asociado. En algún aspecto, los vectores son capaces de replicación

cromosómica extra y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos en una célula hospedadora tal como una célula eucariota y/o procariota. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes unidos de forma operativa se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

El término "tipo natural", como se usa en el presente documento, tiene su significado entendido en la técnica que se refiere a una entidad que tiene una estructura y/o actividad tal como se encuentran en la naturaleza en un estado o contexto "normal" (en contraste con un estado mutante, enfermo, alterado, etc.). Los expertos en la materia apreciarán que los genes y polipéptidos de tipo natural suelen existir en múltiples formas diferentes (por ejemplo, alelos).

Diversos aspectos de la divulgación se describen en detalle en las secciones siguientes. El uso de secciones no pretende limitar la divulgación. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la divulgación. En la presente solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique otra cosa.

Descripción detallada

La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, ratones mejorados y/o modificados que tienen material genético humanizado que codifica un receptor FcγRI para la experimentación sobre respuestas efectoras inmunitarias humanas o de tipo humano.

Receptores Fc

Los receptores para las regiones Fc (es decir, regiones constantes) de las inmunoglobulinas (FcR) desempeñan un papel importante en la regulación de la respuesta inmunitaria. Los FcR están presentes en las células auxiliares de un sistema inmunitario del hospedador para facilitar la eliminación de antígenos foráneos unidos por un anticuerpo. Los FcR también desempeñan un papel importante en el equilibrio de las respuestas activadoras e inhibidoras de las células auxiliares del sistema inmunitario. Los FcR participan en la fagocitosis de los macrófagos, la desgranulación de los mastocitos, la absorción de complejos de anticuerpo-antígeno y la modulación de la respuesta inmunitaria, así como otros procesos del sistema inmunitario.

En ratones y seres humanos, los distintos FcR se expresan diferencialmente en la superficie de diferentes células auxiliares que son específicas de los isotipos de inmunoglobulina presentes en el repertorio de anticuerpos expresados. Por ejemplo, los anticuerpos de inmunoglobulina G (IgG) median las funciones efectoras a través de los receptores de IgG (FcγR). Los FcγR se han clasificado en cuatro grupos: FcγRI activador de alta afinidad (CD64), FcγRIIb inhibidor de baja afinidad (CD32b), FcgRIIa/c (CD32a/c) activador de baja afinidad y FcγRIII activador de baja afinidad (CD16). Aunque cada grupo está presente tanto en ratones como en seres humanos, el número de isoformas y subconjuntos de células inmunitarias en los que están presentes son diferentes. Por ejemplo, Fcγ RIIA y FcγRIIIB se expresan en células auxiliares en seres humanos pero, según los informes, están ausentes de los ratones. Además, las afinidades de los diferentes isotipos de IgG (por ejemplo, IgG1) para cada FcγR son diferentes entre ratones y seres humanos.

FcγRI humano de alta afinidad

El FcγRI humano de alta afinidad (CD64) es una glicoproteína de membrana integral que se une a los anticuerpos de tipo IgG monoméricos con alta afinidad (normalmente con Ka de aproximadamente 10^{-8} a 10^{-9} M). Tras unirse a IgG, CD64 interacciona con una cadena auxiliar conocida como la cadena γ común (cadena γ), que posee un motivo inmunorreceptor de activación basado en tirosina (ITAM, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) que genera la activación celular. En los seres humanos, se ha informado que CD64 se expresa constitutivamente en macrófagos y monocitos, con expresión inducible en leucocitos polimorfonucleares por citocinas tales como IFNγ y G-CSF.

Secuencias de FcγRI

Las secuencias ilustrativas para FcγRI humano, de ratón e hibridado se exponen en la Tabla 3. Para las secuencias de ADNc, los exones consecutivos están separados alternando texto subrayado. Para las secuencias de proteínas, están subrayadas las secuencias extracelulares. Las secuencias a las que se hace referencia son ilustrativas; los expertos en la materia pueden determinar y comparar elementos de secuencia o grados de identidad para diferenciar secuencias adicionales de ratón y ser humano.

TABLA 3

ADNc de FcγRI de ratón NM_010186

ACATTACATG ATTCTTACCA GCTTTGGAGA TGACATGTGG CTTCTAACAA
CTCTGCTACT TTGGGTTCCA GTCGGTGGGG AAGTGGTTAA TGCCACCAAG
GCTGTGATCA CCTTGCAGCC TCCATGGGTC AGTATTTTCC AGAAGGAAAA
TGTCACTTTA TGGTGTGAGG GGCCTCACCT GCCTGGAGAC AGTTCCACAC
AATGGTTTAT CAACGGAACA GCCGTTCAGA TCTCCACGCC TAGTTATAGC
ATCCCAGAGG CCAGTTTTCA GGACAGTGGC GAATACAGGT GTCAGATAGG
TTCCTCAATG CCAAGTGACC CTGTGCAGTT GCAAATCCAC AATGATTGGC
TGCTACTCCA GGCCTCCCGC AGAGTCCTCA CAGAAGGAGA ACCCCTGGCC
TTGAGGTGTC ACGGATGGAA GAATAAACTG GTGTACAATG TGGTTTTCTA
TAGAAATGGA AAATCCTTTC AGTTTTCTTC AGATTCGGAG GTCGCCATTC
TGAAAACCAA CCTGAGTCAC AGCGGCATCT ACCACTGCTC AGGCACGGGA
AGACACCGCT ACACATCTGC AGGAGTGTCC ATCACGGTGA AAGAGCTGTT
TACCACGCCA GTGCTGAGAG CATCCGTGTC ATCTCCCTTC CCGGAGGGGA
GTCTGGTCAC CCTGAACTGT GAGACGAATT TGCTCCTGCA GAGACCCGGC
TTACAGCTTC ACTTCTCCTT CTACGTGGGC AGCAAGATCC TGGAGTACAG
GAACACATCC TCAGAGTACC ATATAGCAAG GGCGGAAAGA GAAGATGCTG
GATTCTACTG GTGTGAGGTA GCCACGGAGG ACAGCAGTGT CCTTAAGCGC
AGCCCTGAGT TGGAGCTCCA AGTGCTTGGT CCCCAGTCAT CAGCTCCTGT
CTGGTTTCAC ATCCTGTTTT ATCTGTCAGT GGGAATAATG TTTTCGTTGA
ACACGGTTCT CTATGTGAAA ATACACAGGC TGCAGAGAGA GAAGAAATAC
AACTTAGAAG TCCCTTTGGT TTCTGAGCAG GGAAAGAAAG CAAATTCCTT
TCAGCAAGTT AGAAGCGATG GCGTGTATGA AGAAGTAACA GCCACTGCGA
GCCAGACCAC ACCAAAAGAA GCGCCCGATG GACCTCGAAG CTCAGTGGGT
GACTGTGGAC CCGAGCAGCC TGAACCCCTT CCTCCCAGTG ACAGTACTGG
GGCACAAACT TCCCAAAGTT GACCCTGAAA CTGTGGGACC ATGGCATGCA
ACTCTTAAAT AAAGCAAATA TACAGACTGG ATCCGGCTGA GACAAGCTGG
GTAATCAGAC ATTTGAAAGG AGACCTATAC CAAAGGGATC TTGCAACACA
TGGAGTCAGG TCACAGCGGG GGTTGTCGAA TGTTTGACCT TATGGAGCAG
GGAAACAGGA AGTGAATCCC ACAGGACTCC CCCCCCCCGC CCATCCCCCT
CCAGGCCGCC CCGGACAGGA CCCAGCTCTG GAAGACTCCA GTCTGAGACT
TGCGGAACCA GAGCAGGGGT GAGATTCCTG CCCAGAAGGG ACAGCTGTGC
CATCCCCTCA CAGGGTGGAT GGGTTCAGGG AAAGGCCTCC CCAGGGACGG
CCTGCGTGTC AGGGGAGCAG ACGCTGATAC AGACAGCTCC ATAGCCTGGG
CTAAAGCTGG CTAAGACCCG GTGGTCATCC TGAGAGCATC GGAATTTGTG
CTCTCCTTCC TACCGTCTCT CTTCATGCAC CCTCCCCAGA TTTGCTGCCC
ACGACCCTCA AAGGACATAG TGGCGGCAGC TAAAGAGTGA AGTGTCAGCA
GTAATCCATC CATCTAACCT CCCTCAGGTC CAGATACCCC CACCCCCAAA
CTCCCACACT CTAGGGGCCT TTTCAGGCAG CCTGCATGTG GTGTCTTAGC
AGAGCTATGG TACAAAGGCT TTTAGCTCTA TCATTATCTG ACAAGCAGAC
AGCACCCTCA GGTGCTCTCA TTGGGTGGTG AGAGCTTTCT CCAGCCTGTA
CCACCTGTAA GCTGGAGTGT GGGGCGGGAA CACTGGCCCA AAGCGTCCCT
ATTGGAAGGC ACGGCTTACA TGGGTGTCAC AAATGCCCTT AGACCACGCA
GGAAGACCGA ATTCTAGAAA CAAGGAGTAG ATCATGTCTC CACTTACTGT
CACTCCTAAG GATCCCCTGA AGGTCTTGGA GCTTCACATC CCTGGAACTC
TAGGGTCTGC CGTGCTAGAG GTCCCAGTCT GCAGAGTGGG TGTGGCATAG
CCTGAGCCTC CCTGGATGTG AACATTAGCA AGGTATATTG GGACCTTTAT
AACCAGGGAC CAATAGGCAT GAGAGGGACC GGGATAATGG ACCACAGTCA
CAGGAGGAGA TACACTCTGT TGTACAATGC ATGCAGAAAC TGTCAAAAAC
AGTGTGGGAG CTGGAGAGAT GATCAGGGGT TAAGAACACT TCCTGCTCTT
CCAGAGGACC TGAGTTCACT TTTTGTAACT GCTTGTAAGT CCAGATGTCG
TCTTCTGATC TCTTTCAAGC ACCCACATGT GCAGGGCATG CAGACACAGA
CATATGAACA AGAACAATTA AAAAATAAAT TATAACTGC (SEQ ID NO: 1)

(continuación)

Proteína FcγRI de ratón NP_034316. 1

MILTSFGDDMWLLTTLLLWVPVGGEVVNATKAVITLQPPWVSIFQKENVTLWCE
GPHLPGDSSTQWFINGTAVQISTPSYSIPEASFQDSGEYRCQIGSSMPSDPVQL
QIHNDWLLLQASRRVLTEGEPLALRCHGWKNKLVYNVVFYRNGKSFQFSSDSEV
AILKTNLSHSGIYHCSGTGRHRYTSAGVSITVKELFTTPVLRASVSSPFPEGSL
VTLNCETNLLLQRPGLQLHFSFYVGSKILEYRNTSSEYHIARAEREDAGFYWCE
VATEDSSVLKRSPELELQVLGPQSSAPVWFHILFYLSVGIMFSLNTVLYVKIHR
LQREKKYNLEVPLVSEQGKKANSFQQVRSDGVYEEVTATASQTTPKEAPDGPRS
SVGDCGPEQPEPLPPSDSTGAQTSQS (SEQ ID NO: 2)

ADNc de FcγRI humano NC_000001. 11

AATATCTTGC ATGTTACAGA TTTCACTGCT CCCACCAGCT TGGAGACAAC
ATGTGGTTCT TGACAACTCT GCTCCTTTGG GTTCCAGTTG ATGGGCAAGT
GGACACCACA AAGGCAGTGA TCACTTTGCA GCCTCCATGG GTCAGCGTGT
TCCAAGAGGA AACCGTAACC TTGCACTGTG AGGTGCTCCA TCTGCCTGGG
AGCAGCTCTA CACAGTGGTT TCTCAATGGC ACAGCCACTC AGACCTCGAC
CCCCAGCTAC AGAATCACCT CTGCCAGTGT CAATGACAGT GGTGAATACA
GGTGCCAGAG AGGTCTCTCA GGGCGAAGTG ACCCCATACA GCTGGAAATC
CACAGAGGCT GGCTACTACT GCAGGTCTCC AGCAGAGTCT TCACGGAAGG
AGAACCTCTG GCCTTGAGGT GTCATGCGTG GAAGGATAAG CTGGTGTACA
ATGTGCTTTA CTATCGAAAT GGCAAAGCCT TTAAGTTTTT CCACTGGAAT
TCTAACCTCA CCATTCTGAA AACCAACATA AGTCACAATG GCACCTACCA
TTGCTCAGGC ATGGGAAAGC ATCGCTACAC ATCAGCAGGA ATATCTGTCA
CTGTGAAAGA GCTATTTCCA GCTCCAGTGC TGAATGCATC TGTGACATCC
CCACTCCTGG AGGGGAATCT GGTCACCCTG AGCTGTGAAA CAAAGTTGCT
CTTGCAGAGG CCTGGTTTGC AGCTTTACTT CTCCTTCTAC ATGGGCAGCA
AGACCCTGCG AGGCAGGAAC ACATCCTCTG AATACCAAAT ACTAACTGCT
AGAAGAGAAG ACTCTGGGTT ATACTGGTGC GAGGCTGCCA CAGAGGATGG
AAATGTCCTT AAGCGCAGCC CTGAGTTGGA GCTTCAAGTG CTTGGCCTCC
AGTTACCAAC TCCTGTCTGG TTTCATGTCC TTTTCTATCT GGCAGTGGGA
ATAATGTTTT TAGTGAACAC TGTTCTCTGG GTGACAATAC GTAAAGAACT
GAAAAGAAAG AAAAAGTGGG ATTTAGAAAT CTCTTTGGAT TCTGGTCATG
AGAAGAAGGT AATTTCCAGC CTTCAAGAAG ACAGACATTT AGAAGAAGAG
CTGAAATGTC AGGAACAAAA AGAAGAACAG CTGCAGGAAG GGGTGCACCG
GAAGGAGCCC CAGGGGGCCA CGTAGCAGCG GCTCAGTGGG TGGCCATCGA
TCTGGACCGT CCCCTGCCCA CTTGCTCCCC GTGAGCACTG CGTACAAACA
TCCAAAAGTT CAACAACACC AGAACTGTGT GTCTCATGGT ATGTAACTCT
TAAAGCAAAT AAATGAACTG ACTTCAACTG GGATACATTT GGAAATGTGG
TCATCAAAGA TGACTTGAAA TGAGGCCTAC TCTAAAGAAT TCTTGAAAAA
CTTACAAGTC AAGCCTAGCC TGATAATCCT ATTACATAGT TTGAAAAATA
GTATTTTATT TCTCAGAACA AGGTAAAAAG GTGAGTGGGT GCATATGTAC
AGAAGATTAA GACAGAGAAA CAGACAGAAA GAGACACACA CACAGCCAGG
AGTGGGTAGA TTTCAGGGAG ACAAGAGGGA ATAGTATAGA CAATAAGGAA
GGAAATAGTA CTTACAAATG ACTCCTAAGG GACTGTGAGA CTGAGAGGGC
TCACGCCTCT GTGTTCAGGA TACTTAGTTC ATGGCTTTTC TCTTTGACTT
TACTAAAAGA GAATGTCTCC ATACGCGTTC TAGGCATACA AGGGGGTAAC
TCATGATGAG AAATGGATGT GTTATTCTTG CCCTCTCTTT TGAGGCTCTC
TCATAACCCC TCTATTTCTA GAGACAACAA AAATGCTGCC AGTCCTAGGC
CCCTGCCCTG TAGGAAGGCA GAATGTAACT GTTCTGTTTG TTTAACGATT
AAGTCCAAAT CTCCAAGTGC GGCACTGCAA AGAGACGCTT CAAGTGGGGA
GAAGCGGCGA TACCATAGAG TCCAGATCTT GCCTCCAGAG ATTTGCTTTA
CCTTCCTGAT TTTCTGGTTA CTAATTAGCT TCAGGATACG CTGCTCTCAT
ACTTGGGCTG TAGTTTGGAG ACAAAATATT TTCCTGCCAC TGTGTAACAT
AGCTGAGGTA AAAACTGAAC TATGTAAATG ACTCTACTAA AAGTTTAGGG
AAAAAAAACA GGAGGAGTAT GACACAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA AAAAAAAA (SEQ ID NO: 3)

(continuación)

Proteína FcγRI humana AAI52384	MWFLTTLLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQ WFLNGTATQTSTPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVS SRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLTILKTNISHNGT YHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLSCETKLLLQR PGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPE LELQVLGLQLPTPVWFHVLFYLAVGIMFLVNTVLWVTIRKELKRKKKWDLEISLD SGHEKKVISSLQEDRHLEEELKCQEQKEEQLQEGVHRKEPQGAT (SEQ ID NO: 4
Ilustrativa	MWFLTTLLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQ WFLNGTATQTSTPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVS
Proteína FcγRI humanizada	SRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLTILKTNISHNGT YHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLSCETKLLLQR PGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPE LELQVLGLQLPTPVWGPQSSAPVWFHILFYLSVGIMFSLNTVLYVKIHRLQREKK YNLEVPLVSEQGKKANSFQQVRSDGVYEEVTATASQTTPKEAPDGPRS SVGDCGPEQPEPLPPSDSTGAQTSQS (SEQ ID NO: 5)

Ratones FcγRI humanizados

Se proporcionan ratones que expresan proteínas receptoras FcγRI humanizadas en la superficie de las células inmunitarias (por ejemplo, células mieloides) de los ratones como resultado de una modificación genética de un locus endógeno del ratón que codifica una proteína FcγRI.

Un gen FcγRI endógeno humanizado comprende material genético de seres humanos, en donde el gen FcγRI endógeno humanizado codifica una proteína FcγRI que comprende la parte codificada del material genético de seres humanos. El gen FcγRI endógeno humanizado de la presente divulgación comprende ADN genómico humano que corresponde a la parte extracelular de una proteína FcγRI que se expresa en la membrana plasmática de una célula. También se proporcionan ratones, embriones de ratón, células de ratón y construcciones de localización específica para crear ratones, embriones de ratón y células de ratón que contengan dicho gen FcγRI endógeno humanizado.

En algunos aspectos, se elimina el locus de FcγRI endógeno. En algunos aspectos, se altera el locus FcγRI endógeno, en donde una parte del locus de FcγRI endógeno se reemplaza con una parte de una secuencia de FcγRI humana que codifica la parte extracelular de una cadena de FcγRI humana que comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano, un dominio EC3 humano o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, todo o sustancialmente todo el locus FcγRI endógeno se reemplaza con un locus heterólogo que codifica una proteína FcγRI de la divulgación. En algunos aspectos, una parte de un locus FcγRI humano se inserta en un locus FcγRI de ratón endógeno.

Un ratón de la divulgación expresa una proteína FcγRI que comprende:

una parte extracelular de una cadena α de FcγRI humano que comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano, un dominio EC3 humano o una combinación de los mismos; y

un dominio citoplasmático de una cadena α de FcγRI de ratón. Por tanto, se puede describir que dichos ratones tienen un gen FcγRI heterólogo en parte. El locus de FcγRI endógeno reemplazado, insertado o modificado se puede detectar usando una variedad de métodos que incluyen, por ejemplo, PCR, transferencia Western, transferencia de Southern, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) o un ensayo de ganancia o pérdida de alelos.

En distintos aspectos, un gen FcγRI humanizado de acuerdo con la presente divulgación incluye un gen FcγRI que tiene un tercer, cuarto y quinto exón, teniendo cada uno una secuencia de al menos un 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntico a un tercer, cuarto y quinto exón que aparecen en un gen FcγRI humano de SEQ ID NO: 3.

En distintos aspectos, un gen FcγRI humanizado de acuerdo con la presente divulgación incluye un gen FcγRI que tiene una secuencia de codificación de nucleótidos (por ejemplo, una secuencia de ADNc) al menos un 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idénticos a los nucleótidos que aparecen en SEQ ID NO: 5.

En distintos aspectos, una proteína FcγRI humanizada producida por un ratón de la presente divulgación tiene una parte extracelular que tiene una secuencia que es al menos un 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una parte extracelular de una proteína FcγRI humana que aparece en la Tabla 3.

En distintos aspectos, una proteína FcγRI humanizada producida por un ratón de la presente divulgación tiene una parte extracelular que tiene una secuencia que es al menos un 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a los restos de aminoácidos 18-288 que aparecen en una proteína FcγRI humana de SEQ ID NO: 4.

En distintos aspectos, una proteína FcγRI humanizada producida por un ratón de la presente divulgación tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una secuencia de aminoácidos de una proteína FcγRI humanizada como la ilustrada en SEQ ID NO: 5.

Se proporcionan composiciones y métodos para la creación de ratones que expresen una proteína FcγRI humanizada, incluidas formas polimórficas específicas o variantes alélicas (por ejemplo, diferencias de aminoácidos individuales), incluyendo composiciones y métodos para la creación de ratones que expresen dichas proteínas a partir de un promotor humano y una secuencia reguladora humana. En algunos aspectos, también se proporcionan composiciones y métodos para la creación de ratones que expresen dichas proteínas a partir de un promotor endógeno y una secuencia reguladora endógena. Los métodos incluyen la inserción del material genético que codifica una proteína FcγRI humana en parte en una ubicación exacta del genoma de un ratón que corresponde a un gen FcγRI endógeno, creando así un gen FcγRI humanizado que exprese una proteína FcγRI que sea parcialmente humana. En algunos aspectos, los métodos incluyen la inserción de ADN genómico correspondiente a los exones 3-5 en un gen humanizado que codifica una proteína FcγRI que contiene una parte humana que contiene aminoácidos codificados por los exones insertados.

Un enfoque del gen FcγRI endógeno humanizado emplea una modificación relativamente mínima del gen endógeno y genera respuestas efectoras mediadas por FcγRI natural en el ratón, en distintos aspectos, porque la secuencia genómica de las secuencias de FcγRI se modifica en un solo fragmento y, por lo tanto, conserva la funcionalidad normal al incluir las secuencias reguladoras necesarias. Por tanto, en dichos aspectos, la modificación del gen FcγRI no afecta a otros genes circundantes ni a otros genes FcγRI endógenos. Además, en distintos aspectos, la modificación no afecta al ensamblaje de un receptor funcional en el plasma y mantiene las funciones efectoras normales a través de la unión y posterior transducción de señal a través de la parte citoplasmática del receptor que se ve mínimamente o nada afectada por la modificación.

En la Figura 5, se proporciona una ilustración esquemática (no a escala) de un gen FcγRI murino endógeno y un gen FcγRI endógeno humanizado. Como se ilustra, el ADN genómico que contiene los exones 3-5 de un gen FcγRI humano se inserta en un locus del gen FcγRI murino endógeno mediante una construcción dirigida. Este ADN genómico incluye la parte del gen que codifica una o más regiones de dominio extracelular (por ejemplo, los residuos de aminoácidos 28-362) de una proteína FcγRI humana que participa en la unión de Fc.

Un ratón que tenga un gen FcγRI endógeno humanizado se puede crear mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede fabricar un vector de localización específica que introduzca un gen FcγRI humano completo o parcial con un gen marcador de selección. La Figura 5 ilustra un genoma de ratón que comprende una inserción de los exones 1-5 de un FcγRI humano. Como se ilustra, la construcción de localización específica contiene un brazo de homología 5' que contiene la secuencia cadena arriba del exón 1 de un gen FcγRI endógeno murino, seguido de un fragmento de ADN genómico que contiene los exones 1-5 de un gen FcγRI humano, un casete de selección de fármacos (por ejemplo, un gen de resistencia a la neomicina flanqueado en ambos lados por secuencias *loxP*) y un brazo de homología 3' que contiene la secuencia cadena abajo de los exones 6 de un gen FcγRI murino endógeno. Tras la recombinación homóloga, los exones 1-5 y una parte del exón 6 de un gen FcγRI murino endógeno se reemplaza por la secuencia contenida en el vector de localización específica. Se crea un gen FcγRI endógeno humanizado que dé lugar a una célula de ratón o a un ratón que exprese una proteína FcγRI humanizada que contenga aminoácidos codificados por los exones 1-5 de un gen FcγRI humano. El casete de selección de fármacos puede retirarse opcionalmente mediante la adición posterior de una recombinasa (por ejemplo, mediante tratamiento con Cre).

En algunos aspectos, los ratones comprenden un gen FcγRI humanizado unido operativamente a un promotor FcγRI endógeno. En algunos aspectos, los ratones expresan una proteína FcγRI humanizada de un locus endógeno, en donde la proteína FcγRI humanizada comprende los restos de aminoácidos 16-290 de una proteína FcγRI humana.

Otros métodos que pueden emplearse para la creación de un ratón que comprenda modificaciones genéticas según lo descrito en el presente documento incluyen, por ejemplo, la modificación del genoma de una célula no ES (*Embryonic Stem*, madre embrionaria) (por ejemplo, un fibroblasto o una célula pluripotente inducida) y emplear la transferencia nuclear para transferir el genoma modificado a una célula adecuada, por ejemplo, un ovocito, y gestar la célula modificada (por ejemplo, el ovocito modificado) en un ratón en las condiciones adecuadas para formar un embrión.

El animal no humano de la presente divulgación es un ratón.

En algunos aspectos, un ratón de la presente divulgación es un ratón de una cepa C57BL seleccionada entre C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr y C57BL/O1a. En algunos aspectos determinados, un ratón de la presente divulgación 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, 129/SvJae, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (véase, por ejemplo, Festing *et al*., 1999, *Mammalian Genome* 10:836; Auerbach *et al*., 2000, *Biotechniques* 29(5): 1024-1028, 1030, 1032). En algunos aspectos determinados, un ratón modificado genéticamente de la presente divulgación es una mezcla de una cepa 129 mencionada anteriormente y una cepa C57BL/6 mencionada anteriormente. En algunos aspectos determinados, un ratón de la presente divulgación es una mezcla de las cepas 129 mencionadas anteriormente o una mezcla de las cepas BL/6 mencionadas anteriormente. En algunos aspectos determinados, una cepa 129 de la mezcla como se describe en el presente documento es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En algunos aspectos, un ratón de la presente divulgación es una cepa BALB, por ejemplo, cepa BALB/c. En algunos aspectos, un ratón de la presente divulgación es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa mencionada anteriormente.

ELIMINADO

Se ha informado de animales no humanos mutantes y transgénicos FcγR (por ejemplo, ratones), por ejemplo, por van de Winkel *et al*., en la Patente de EE.UU. n.º 6.111.166.

Dichos animales se han empleado en ensayos para evaluar los aspectos moleculares de la expresión, función y regulación de FcγRI. Sin embargo, no están exentos de limitaciones y desventajas. Por ejemplo, el ratón desvelado en la patente .166 contiene FcγRI humano insertado aleatoriamente en su genoma, lo que (1) puede interrumpir la expresión y/o función de otros genes no intencionadamente, si se detecta o no; y (2) produce la expresión de FcγRI tanto completamente humano como completamente de ratón, lo que complica o confunde el estudio particular de un solo tipo de FcγR. Además, la región de señalización intracelular de la cadena α de FcγRI se puede perturbar, interrumpir o afectar de otra manera no de acuerdo con el FcγRI normal en el ratón desvelado en la patente .116, porque la región intracelular de la cadena α de FcγRI que participa en la transducción de señales es humana en lugar de ser de ratón.

La presente divulgación proporciona un medio para superar estas y otras desventajas. La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, un transgén FcγRI humanizado insertado en un locus de ratón endógeno para reemplazar el FcγRI de ratón con un gen FcγRI humano o híbrido. En algunos aspectos, se inserta un gen FcγRI híbrido en el locus endógeno del ratón, en donde el dominio extracelular comprende una secuencia humana y el dominio intracelular comprende una secuencia de ratón. En algunos aspectos, la inserción de un gen FcγRI híbrido en un locus endógeno del gen FcγRI de ratón proporciona la expresión de la proteína FcγRI en las células inmunitarias que se parece más a la distribución de la proteína FcγRI humana en las células inmunitarias humanas en comparación con la distribución de la expresión de la proteína FcγRI humana en las células inmunitarias de un ratón que además expresa una proteína FcγRI endógena de ratón. En algunos aspectos, la inserción de un gen FcγRI híbrido en un locus endógeno del gen FcγRI de ratón proporciona la expresión de la proteína FcγRI en las células inmunitarias que es inducida y regulada por señales y estímulos apropiados.

En algunos aspectos, la presentación mediada por la cadena α de FcγRI de antígenos MHC de clase II se mantiene funcionalmente en ratones que tienen una proteína FcγRI híbrida con una región extracelular humanizada, una región intracelular de la cadena α de FcγRI de ratón. En algunos aspectos, el procesamiento intracelular de FcγRI internalizado se conserva en un ratón que tiene una proteína FcγRI híbrida con una región intracelular de ratón en comparación con la de un ratón que tiene una proteína FcγRI completamente humana o una proteína FcγRI con una región intracelular no murina.

Los ratones de la presente divulgación proporcionan un sistema *in vivo* mejorado y una fuente de materiales biológicos (por ejemplo, células) que expresan FcγRI humano que son útiles para una variedad de ensayos. En distintos aspectos, los ratones de la presente divulgación se usan para desarrollar agentes terapéuticos que se dirigen a FcγRI y/o modulan la señalización de FcγRI y las respuestas efectoras inmunitarias. En distintos aspectos, los ratones de la presente divulgación se usan para seleccionar y desarrollar agentes terapéuticos candidatos (por ejemplo, anticuerpos) a los que se une FcγRI. En distintos aspectos, los ratones de la presente divulgación se usan para determinar la respuesta efectora inmunitaria asociada con un determinado anticuerpo terapéutico.

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

En un aspecto, un ratón de acuerdo con la divulgación puede usarse para determinar un efecto citotóxico perdido (en comparación con un ratón de tipo natural) mediante un ratón que no expresa genes FcγR de alta afinidad a través de

la administración de un agente a dicho ratón, donde se sabe que el agente desencadena un efecto citotóxico dependiente de FcγR en ratones de tipo natural. En un aspecto, se implantan, en un ratón de la presente divulgación, células tumorales y, tras un período de tiempo posterior, se les inyecta un anticuerpo específico de un antígeno expresado en la superficie de las células tumorales. El isotipo del anticuerpo se conoce antes de la inyección y los animales se analizan para determinar el deterioro de la ADCC dependiente de FcγR en comparación con la ADCC observada en animales de tipo natural.

En un aspecto, los ratones deficientes en receptores endógenos de alta afinidad podrían combinarse (por ejemplo, mediante reproducción) con otros ratones inmunodeficientes para desarrollar modelos *in vivo* de enfermedad autoinmunitaria. Por ejemplo, los ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID, *Severe Combined Immunodeficiency*) se usan rutinariamente en la técnica como organismos modelo para estudiar el sistema interno. Los ratones Scm tienen una capacidad deteriorada para producir linfocitos T o B, o para activar algunos componentes del sistema del complemento, y no pueden combatir eficazmente las infecciones, rechazar tumores y rechazar trasplantes. Se pueden cruzar ratones deficientes en el gen de la subunidad a de FcγR de alta afinidad de la presente divulgación con ratones SCID para determinar el agotamiento celular en un animal hospedador en respuesta a la administración de un anticuerpo terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo antitumoral), lo que determinaría los roles de la ADCC y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, *Complement Dependent Cytotoxicity*) en el agotamiento de las células tumorales *in vivo*.

Se describen ratones modificados genéticamente que comprenden un reemplazo de los genes FcγR endógenos de alta afinidad con genes FcγR humanos de alta afinidad. Dichos animales son útiles para estudiar la farmacocinética de anticuerpos completamente humanos y de la ADCC mediada por FcγR. Además, se ha demostrado que los genes FcγR humanos presentan polimorfismos o variantes alélicas asociadas con la enfermedad. Por tanto, se pueden usar ratones genéticamente modificados que comprenden un reemplazo de los genes FcγR endógenos de alta afinidad con formas alélicas o polimórficas específicas de los genes FcγR humanos para estudiar enfermedades autoinmunitarias humanas y los rasgos asociados con los polimorfismos, en el animal. En algunos aspectos, las formas alélicas de los genes FcγR humanos están asociadas con una mayor eficacia para la IgG humana.

En algunos aspectos, usando los ratones de la divulgación, se determina el efecto de un polimorfismo de FcγR humano de alta afinidad sobre la eficacia de un anticuerpo terapéutico humano. En algunos aspectos, se administra un anticuerpo antitumoral a un primer ratón humanizado que comprende un primer polimorfismo de un FcγR humano y también a un segundo ratón humanizado que comprende un segundo polimorfismo de un FcγR humano, en donde el primer y el segundo ratón comprenden cada uno una célula tumoral humana; y se evalúa la actividad antitumoral del anticuerpo antitumoral en el primer ratón y en el segundo ratón.

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

El enfoque de reemplazo de la cadena α de FcγRI endógeno emplea una interrupción relativamente mínima de la transducción de señal mediada por FcγR natural en el ratón. En distintos aspectos, la secuencia genómica de las cadenas α de FcγR se reemplaza en un solo fragmento y, por lo tanto, conservan la funcionalidad normal al incluir las secuencias reguladoras necesarias. Por tanto, en dichos aspectos, La modificación de la cadena α de FcγR no perjudica a otros FcR endógenos que dependen de moléculas funcionales de la cadena γ de FcR. Además, en distintos aspectos, la modificación no afecta al ensamblaje del complejo receptor funcional que implica una cadena α de FcγR y la cadena γ de FcR endógeno, que puede ser importante para la expresión adecuada de algunas cadenas α de FcγR en la superficie celular y para cierta señalización cadena abajo resultante de un receptor activado. Debido a que la cadena γ de FcR no se elimina, en distintos aspectos, los animales que contienen un reemplazo de genes de la cadena α de FcγR endógenos con genes de la cadena α de FcγR humanos pueden procesar funciones efectoras normales de los anticuerpos mediante la unión de la parte Fc de las inmunoglobulinas IgG a las cadenas α de FcγR de ser humano presentes en la superficie de células auxiliares.

Los ratones de la presente divulgación expresan la proteína FcγRI humanizada, así pues, es posible generar células, estirpes celulares y cultivos celulares para servir como fuente de FcγRI humanizado para su uso en ensayos de unión y funcionales, por ejemplo, para analizar la unión o la función de FcγRI a un posible anticuerpo terapéutico. En distintos aspectos, una proteína FcγRI humanizada expresada por un ratón según lo descrito en el presente documento puede comprender una variante de secuencia de aminoácidos. Se ha informado de variantes de proteínas FcγRI humanas que tienen variaciones asociadas con restos de unión al ligando. En distintos aspectos, los ratones de la presente divulgación expresan una variante de proteína FcγRI humanizada. En distintos aspectos, la variante es polimórfica en una posición de aminoácidos asociada con la unión al ligando. En distintos aspectos, los ratones de la presente divulgación se usan para determinar la respuesta efectora inmunitaria de un anticuerpo terapéutico a través de la interacción con una variante polimórfica de FcγRI humano.

Las células de ratones de la presente divulgación pueden aislarse y usarse de manera *ad hoc*, o pueden mantenerse en cultivo durante muchas generaciones. En distintos aspectos, las células de un ratón de la presente divulgación se inmortalizan y se mantienen en cultivo indefinidamente (por ejemplo, en cultivos en serie).

Los ratones de la presente divulgación proporcionan mecanismos mejorados de dilucidación del sistema i*n vivo* de la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos en la materia cómo hacer y usar los métodos y las composiciones de la divulgación, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su divulgación. A menos que se indique otra cosa, la temperatura se indica en grados centígrados, y la presión es la atmosférica o casi atmosférica.

Ejemplo 1. Humanización de un gen FcγRI endógeno.

Este ejemplo ilustra métodos ilustrativos de humanización de un gen endógeno que codifica FcγRI de alta afinidad en un mamífero no humano tal como un roedor (por ejemplo, un ratón).

Construcción del vector de humanización de localización específica de FcγRI (MAID6074)

Se construyó un gran vector de localización específica (LTVEC, *Large Targeting VECtor*) usando el gen del receptor Fc Gamma humano 1 (región promotora, región de señal más dominio ecto) para reemplazar la secuencia de homólogos de ratón en el cromosoma 3 murino.

Generación de vectores de localización específica basados en BAC (MAID6073)

Se identificaron BAC RP23-477p23 de ratón y BAC CTD-2339o22 humano que contenían el gen de FcγRI usando BLAST y la secuencia final de BAC basándose en la base de datos del NCBI y Ensemble.

El enfoque para generar vectores de localización específica, en donde el LTVEC contenía una secuencia humana desde el promotor del gen FcγRI (extremo distal 5') (25 kb) hasta el extremo proximal 3' en el codón del gen W290 (antes de su dominio transmembrana (TM)) del gen FcγRI humano, (seguido del dominio transmembrana del ratón y del resto del gen), implica las siguientes etapas.

En primer lugar, mediante recombinación homóloga en bacterias, se eliminó el extremo 5’ de la secuencia humana del BAC humano (CTD-2339o22) y se dejó un sitio I-Ceu1 y una región promotora de 25 kb del gen FcγRI, se eliminó el extremo 3’ de la secuencia humana con el casete pgk-Neo flanquedo por sitios loxp ubicado en el intrón 5 (404 pb cadena arriba del dominio TM) del gen FcγRI, seguido por el sitio AsiS1.

En segundo lugar, mediante recombinación homóloga en bacterias, en el BAC RP23-477p23 de ratón, el gen FcγRI de ratón (desde su promotor (20 kb) hasta el dominio transmembrana) se eliminó con un casete Spec (8 aa del dominio EC3 de la secuencia de FcγRI humana (hasta el codón W290)) añadido antes del TM de ratón) flanqueado por I-Ceu1 y AsiS1 sitios.

En tercer lugar, se realizó la digestión y ligadura por los sitios I-Ceu1 y AsiS1 para generar la secuencia humana contenida en LTVEC (MAID6073) desde el promotor del gen FcγRI (extremo distal 5’) (25 kb) hasta el extremo proximal 3’ en el codón W290 (antes del dominio transmembrana) del FcγRI humano, seguido del dominio transmembrana del ratón y del resto del gen.

La Figura 32 representa un esquema y una estrategia ilustrativa para la humanización del FcγRI de ratón. MAID6074 es la versión de casete eliminado de MAID6073. Las secuencias de unión se muestran en la Figura 6.

Selección de células ES de ratón diana

El LTVEC MAID 6074 se sometió a electroporación en la estirpe de células ES de ratón F1H4.

Ejemplo 2. Generación de ratones humanizados FcγRI de alta afinidad

Este ejemplo ilustra la transformación y la cría de ratones. Se sometió a electroporación el LTVEC del dominio ecto de hFcgR1 (MAID 6073) en células madre embrionarias (ES) de ratón F1H4 parentales. Se seleccionaron las colonias que sobrevivieron a la selección del fármaco G418 y se examinaron en busca de la recombinación homóloga de la secuencia de FcγRI humano en el locus de FcγRI de ratón. Se identificaron ocho clones que tenían la modificación apropiada y que eran heterocigotos para el dominio ecto de FcγRI humano, uno de los cuales era el clon 6073F-D2. Todos estos clones contenían el casete neo.

El clon 6073F-D2 se sometió a electroporación con 2 µg de plásmido Cre para eliminar el casete neo. Se seleccionaron las colonias y luego se examinaron en busca de la ausencia del casete neo. De los clones en los que se determinó la eliminación del casete neo, se microinyectaron los clones de ES 6074B-A1 y 6074B-A10 usando el método

VelociMouse.

Se generaron ratones VelociMice F0 machos y hembras (hembra XY) a partir de los clones 6074B-A1 y 6074B-A10. Estos ratones F0 se cruzaron entre sí en parejas clonales y no clonales. Se produjeron ratones F1 y se demostró que estos ratones eran heterocigotos y homocigotos (y de tipo natural) para el FcγRI humano. Los ratones F1 parecían normales, y la proporción de ratones Hom:Het:WT seguía la proporción mendeliana predicha de 1:2:1. Se transfirieron para su estudio las cohortes de machos y hembras que eran de tipo natural y homocitogas para FcγRI humano.

Ejemplo 3. Caracterización de ratones humanizados con FcγRI de alta afinidad

Este ejemplo ilustra la expresión característica de la proteína FcγRI de alta afinidad en la superficie de las células de animales no humanos modificados para contener una construcción del gen FcγRI humanizado según lo descrito en el Ejemplo 1 en un locus de FcγRI endógeno.

La caracterización genotípica de ratones humanizados con FcγRI de alta afinidad se muestra en las Figuras 1-3. No se detecta la transcripción para FcγRI de ratón en los ratones homocigotos para FcγRI humanizado.

Los resultados de la caracterización fenotípica se muestran en las Figuras 4 y 7-16.

Ejemplo 4. Caracterización fenotípica de ratones humanizados para FcγRI de alta afinidad tratados con factor estimulante de colonias de granulocitos murino (mG-CSF)

Se realizó un análisis fenotípico para ratones MAID 6074 (hFcγRI) HO tratados con G-CSF murino (mG-CSF) frente a control de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los ratones fueron examinados 48 horas después de la inyección subcutánea. Los datos se muestran para ratones MAID 6074 WT de 6-7 semanas de vida tratados con PBS (n = 2) o mG-CSF (n = 2) en comparación con los ratones MAID 6074 HO tratados con PBS (n = 2) o mG-CSF (n = 3). Los resultados fueron similares para los ratones MAID 6074 WT de 16-17 semanas de vida tratados con PBS (n = 1) o mG-CSF (n = 1) en comparación con ratones MAID 6074 HO tratados con PBS (n = 1) o mG-CSF (n = 1). La expresión de la línea basal (PBS) y la inducida por mG-CSF de FcγRI hibridado y de ratón en monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas en sangre y bazo de ratones MAID 6074 WT y MAID 6074 HO se muestran en las Figuras 17-31.

Los ratones MAID 6074 HO no tratados expresan ARNm de FcγRI (CD64) en sangre, aunque la proteína no fue detectada mediante FACS. El G-CSF (48 horas) indujo un aumento en el ARNm de FcγRI (CD64) en sangre y bazo, y en la proteína detectada mediante FACS.

Ejemplo 5. Caracterización fenotípica de ratones que expresan receptores de Fcγ humanizados de alta y baja afinidad

Se generaron ratones que expresaban receptores de Fcγ humanizados de alta afinidad y baja afinidad usando técnicas de reproducción convencional. Específicamente, se cruzaron ratones que expresaban FcγRI humanizado de alta afinidad generado según lo descrito en los Ejemplos 1 y 2 con ratones que expresaban FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa y FcγRIIIb humanizados de baja afinidad generados según lo descrito en los Ejemplos 1-6 y las Figuras 1-6 de la publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. 2014/0154701. Los ratones resultantes fueron cruzados hasta la homocigosidad.

Se realizó un análisis fenotípico en los ratones con FcγR humanizados de alta y baja afinidad después del tratamiento con G-CSF murino (mG-CSF) o un control de solución salina tamponada con fosfato (PBS). A los ratones se les administró una inyección subcutánea de PBS o mG-CSF (62 µg s.c., dosis única). Después de 48 horas, se extrajeron la sangre y el bazo de los ratones tratados, y se caracterizaron fenotípicamente mediante FACS según lo descrito en el Ejemplo 4. El fenotipo de la superficie celular de los ratones FcγR humanizados de alta y baja afinidad fue similar al fenotipo observado para los ratones humanizados FcγR de alta afinidad. También al igual que los ratones humanizados con receptor Fcγ de alta afinidad, los ratones en los que se humanizaron los receptores Fcγ de alta y baja afinidad mostraron una mayor expresión de FcγRI humano en sangre y monocitos, macrófagos y neutrófilos esplénicos. En resumen, la humanización de los receptores Fcγ de baja afinidad en los ratones humanizados con FcγRI no produjo un cambio fenotípico significativo.

ELIMINADO.

El uso de términos ordinales tales como "primero", "segundo", "tercero", etc., en las reivindicaciones para modificar un elemento de una reivindicación no denota por sí mismo ninguna prioridad, precedencia, u orden de un elemento reivindicado respecto de otro, o un orden temporal para llevar a cabo los actos de un método, sino que se usan simplemente como etiquetas para distinguir un determinado elemento que tiene un determinado nombre de otro elemento que tiene el mismo nombre (salvo por el uso del término ordinal) para distinguir los elementos de la reivindicación.

Se ha de entender que los artículos "un" y "una" como se usan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, incluyen los referentes en plural. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean o son relevantes de otro modo para un producto o proceso dado, a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto. La divulgación incluye aspectos en los que exactamente un elemento del grupo está presente, se emplea o es relevante de otro modo para un producto o proceso dado. La divulgación también incluye aspectos en los que más de uno o todos los elementos del grupo están presentes, se emplean o son relevantes de otro modo para un producto o proceso dado. Cuando los elementos se presentan como listas, (por ejemplo, en el grupo Markush o en un formato similar) debe entenderse que también se desvela cada subgrupo de los elementos, y que se puede eliminar cualquier elemento del grupo. Debería comprenderse que, en general, cuando se hace referencia a la divulgación o a aspectos de la divulgación como aquellos que comprenden determinados elementos, características, etc., ciertos aspectos de la divulgación o aspectos de la divulgación consisten, o consisten sustancialmente en, dichos elementos, características, etc. Con el fin de simplificar, esos aspectos no se han establecido en todos los casos específicamente con tantas palabras en el presente documento. También debe entenderse que cualquier aspecto de la divulgación puede excluirse explícitamente de las reivindicaciones, independientemente de si la exclusión específica se menciona o no en la memoria descriptiva.

Los expertos en la materia apreciarán las desviaciones típicas o el error atribuibles a los valores obtenidos en ensayos u otros procesos descritos en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un ratón que expresa, a partir de un gen FcγRI que comprende un promotor FcγRI y una secuencia reguladora, una proteína FcγRI que comprende:

una parte extracelular de una cadena α de FcγRI humano que comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano, un dominio EC3 humano o una combinación de los mismos; y
un dominio citoplasmático de una cadena α de FcγRI de ratón.

2. El ratón de la reivindicación 1, en donde la parte extracelular de una cadena α de FcγRI humano comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano y un dominio EC3 humano.

3. El ratón de la reivindicación 1 o 2, en donde:

(a) el dominio EC1 está codificado por un exón al menos un 90 % idéntico al exón 3 de SEQ ID NO: 3; o
(b) el dominio EC2 está codificado por un exón al menos un 90 % idéntico al exón 4 de SEQ ID NO: 3; o
(c) el dominio EC3 está codificado por un exón al menos un 90 % idéntico al exón 5 de SEQ ID NO: 3.

4. El ratón de la reivindicación 1, en donde:

(a) el ratón no expresa de manera detectable una cadena α de FcγRI de ratón de longitud completa;
(b) la proteína FcγRI comprende además un dominio transmembrana de cadena α de FcγRI completo o parcial;
(c) la proteína FcγRI comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena α de FcγRI al menos un 90 % idéntica a SEQ ID NO: 5; o
(d) la proteína FcγRI se expresa en monocitos, macrófagos, neutrófilos o células dendríticas, preferentemente, en donde la expresión de la proteína FcγRI aumenta tras la administración de factor estimulante de colonias de granulocitos murinos (mG-CSF) al ratón.

5. Un ratón que comprende un gen FcγRI que comprende un promotor FcγRI y una secuencia reguladora y al menos un exón de un gen FcγRI humano que codifica una parte extracelular de la proteína FcγRI humana unida operativamente a al menos un exón de un gen FcγRI de ratón que codifica un parte intracelular de una proteína FcγRI de ratón.

6. El ratón de la reivindicación 5, en donde:

(a) el exón del gen FcγRI humano se selecciona del grupo que consiste en los exones 3, 4 y 5; o
(b) el ratón no expresa un gen FcγRI funcional de ratón.

7. El ratón de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:

(a) dicho promotor FcγRI y dicha secuencia reguladora son un promotor FcγRI y una secuencia reguladora de ser humano; o
(b) dicho promotor FcγRI y dicha secuencia reguladora son un promotor FcγRI y una secuencia reguladora de ratón.

8. Una célula madre embrionaria de ratón cuyo genoma comprende un gen FcγRI que comprende un promotor FcγRI y una secuencia reguladora, y que codifica una proteína FcγRI que comprende:

una parte extracelular de una cadena α de FcγRI humano que comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano, un dominio EC3 humano o una combinación de los mismos; y
un dominio citoplasmático de una cadena α de FcγRI de ratón.

9. La célula madre embrionaria de ratón de la reivindicación 8, en donde:

(a) el gen FcγRI comprende los exones 3, 4 y 5 de un gen FcγRI humano;
(b) el gen FcγRI comprende además una o más regiones 5' no traducidas humanas que flanquean al exón 1 humano;
(c) la célula comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena α de FcγRI al menos un 90 % idéntica a SEQ ID NO: 5;
(d) el gen FcγRI comprende el exón 6 de un gen FcγRI de ratón; y/o
(e) el gen FcγRI se encuentra en un locus de FcγRI endógeno.

10. Un embrión de ratón generado a partir de la célula madre embrionaria de ratón de la reivindicación 8.

11. Un método de creación de un ratón que expresa, a partir de un gen FcγRI que comprende un promotor FcγRI y una secuencia reguladora, una proteína FcγRI que comprende una parte extracelular de una cadena α de FcγRI

humano que comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano, un dominio EC3 humano, o una combinación de los mismos, y un dominio citoplasmático de una cadena α de FcγRI de ratón, comprendiendo el método las etapas de:

(a) obtener una célula madre embrionaria de ratón de la reivindicación 8; y
(b) crear un ratón usando la célula embrionaria de (a).

12. Un método de creación de un ratón que comprende modificar genéticamente el ratón de manera que exprese, a partir de un gen FcγRI que comprende un promotor FcγRI y una secuencia reguladora, una proteína FcγRI que comprende:

una parte extracelular de una cadena α de FcγRI humano que comprende un dominio EC1 humano, un dominio EC2 humano, un dominio EC3 humano o una combinación de los mismos; y
un dominio citoplasmático de una cadena α de FcγRI de ratón.

13. El método de la reivindicación 12, en donde:

(a) el ratón se modifica genéticamente de manera que no expresa de manera detectable una cadena α de FcγRI de ratón de longitud completa;
(b) el ratón se modifica genéticamente de manera que la proteína FcγRI comprende además un dominio transmembrana de la cadena α de FcγRI de ratón completo o parcial;
(c) el ratón se modifica genéticamente de manera que la proteína FcγRI comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena α de FcγRI al menos un 90 % idéntica a SEQ ID NO: 5; o
(d) el ratón se modifica de manera que la proteína FcγRI se expresa en monocitos, macrófagos, neutrófilos o células dendríticas, preferentemente, en donde el ratón se modifica genéticamente de manera que la expresión de la proteína FcγRI se aumenta tras la administración del factor estimulante de colonias de granulocitos murinos (mG-CSF) al ratón.

14. El método de la reivindicación 12 o 13, en donde el ratón se modifica genéticamente de manera que:

(a) el dominio EC1 está codificado por un exón al menos un 90 % idéntico al exón 3 de SEQ ID NO: 3;
(b) el dominio EC2 está codificado por un exón al menos un 90 % idéntico al exón 4 de SEQ ID NO: 3; o
(c) el dominio EC3 está codificado por un exón al menos un 90 % idéntico al exón 5 de SEQ ID NO: 3.

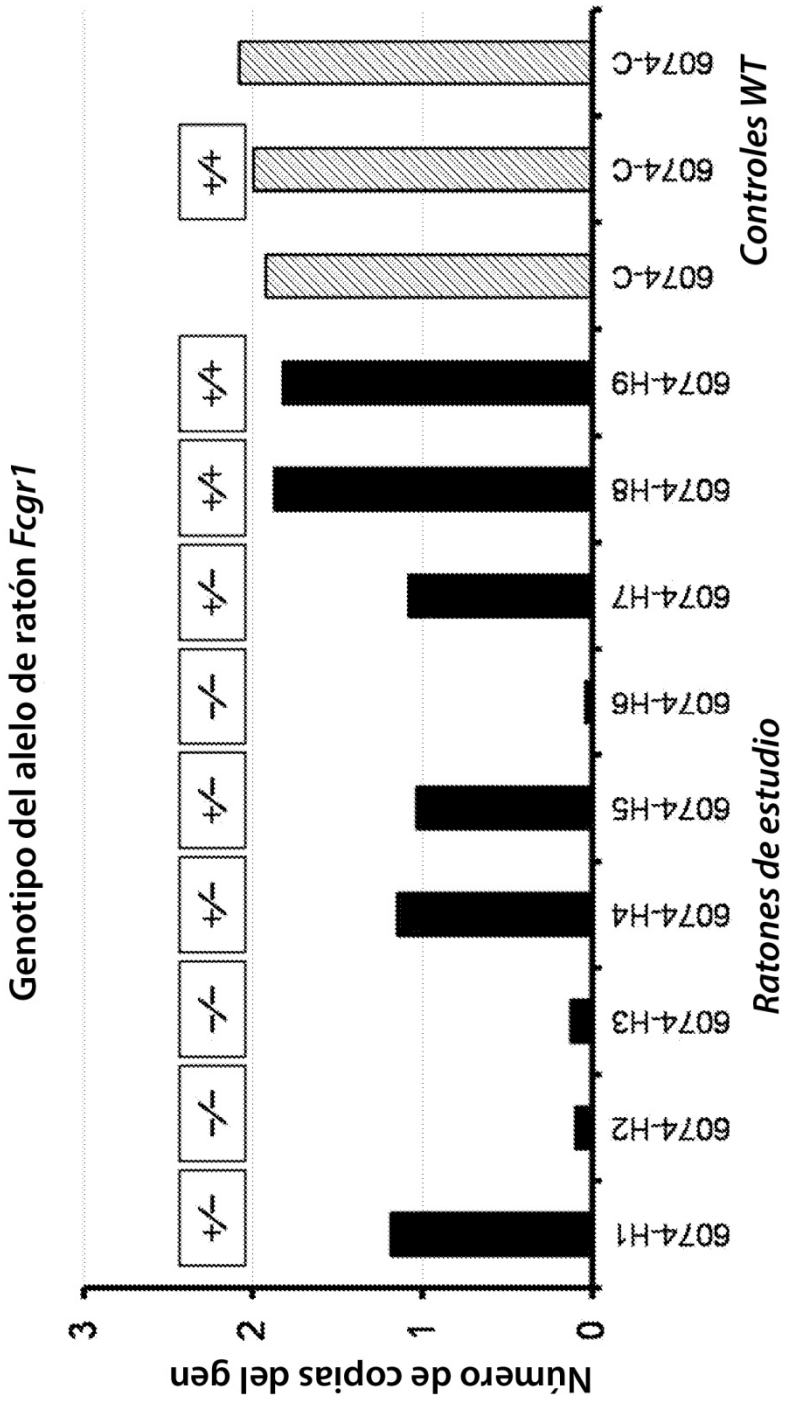
15. Un método de creación de un ratón que comprende modificar genéticamente el ratón para que comprenda, en su genoma, un gen FcγRI que comprenda el promotor FcγRI y la secuencia reguladora, y al menos un exón de un gen FcγRI humano que codifique una parte extracelular de la proteína FcγRI humana unida operativamente al menos a un exón de un gen FcγRI de ratón codificante de una parte intracelular de una proteína FcγRI de ratón.

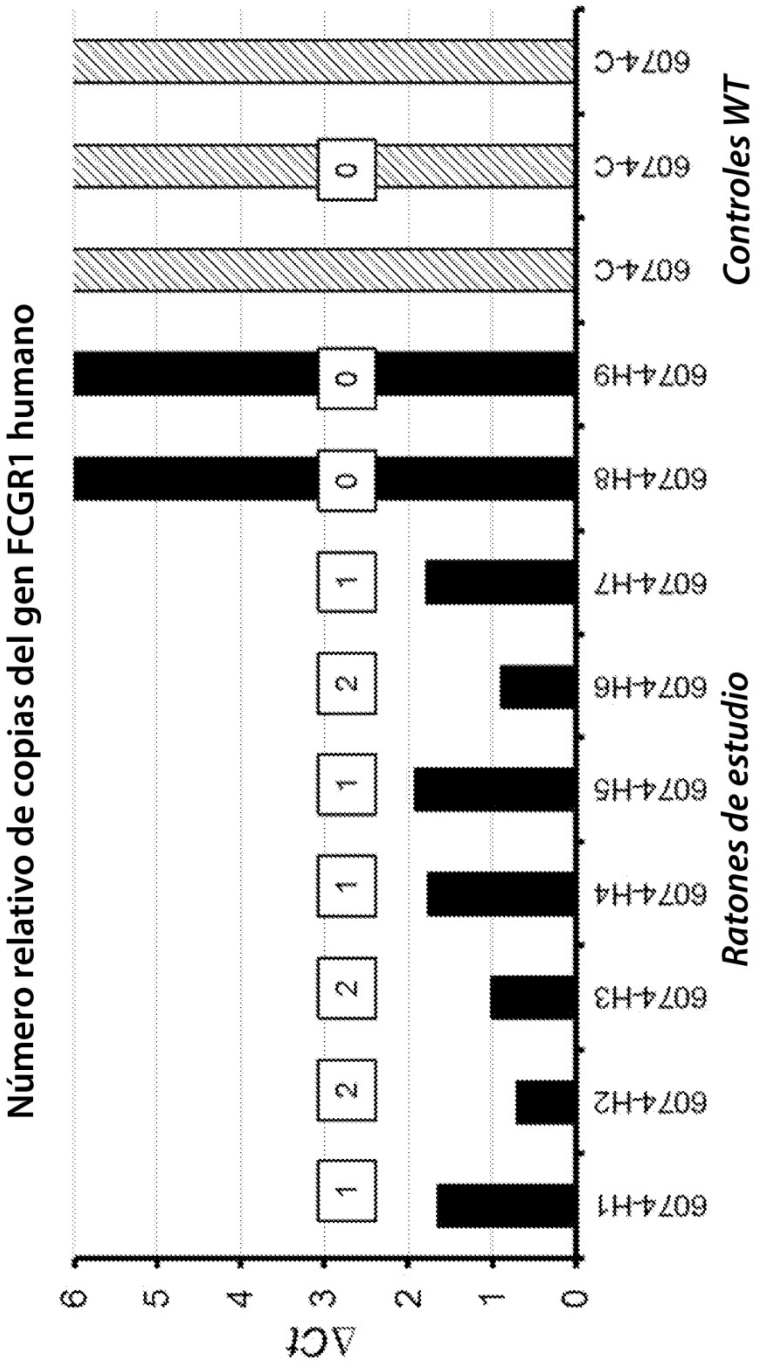
16. El método de la reivindicación 15, en donde el ratón se modifica genéticamente de manera que:

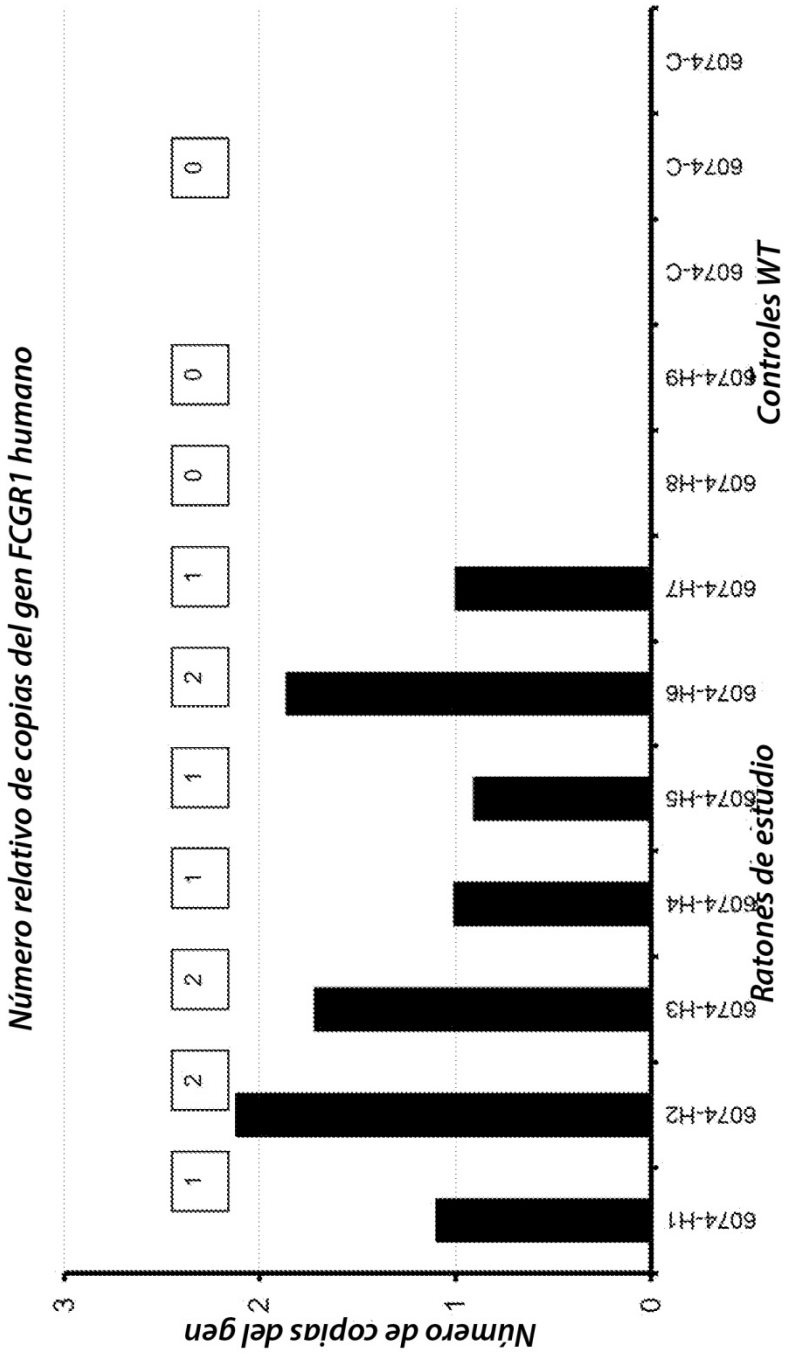
(a) el exón del gen FcγRI humano se selecciona del grupo que consiste en los exones 3, 4 y 5; o
(b) el ratón no expresa un gen FcγRI funcional de ratón.

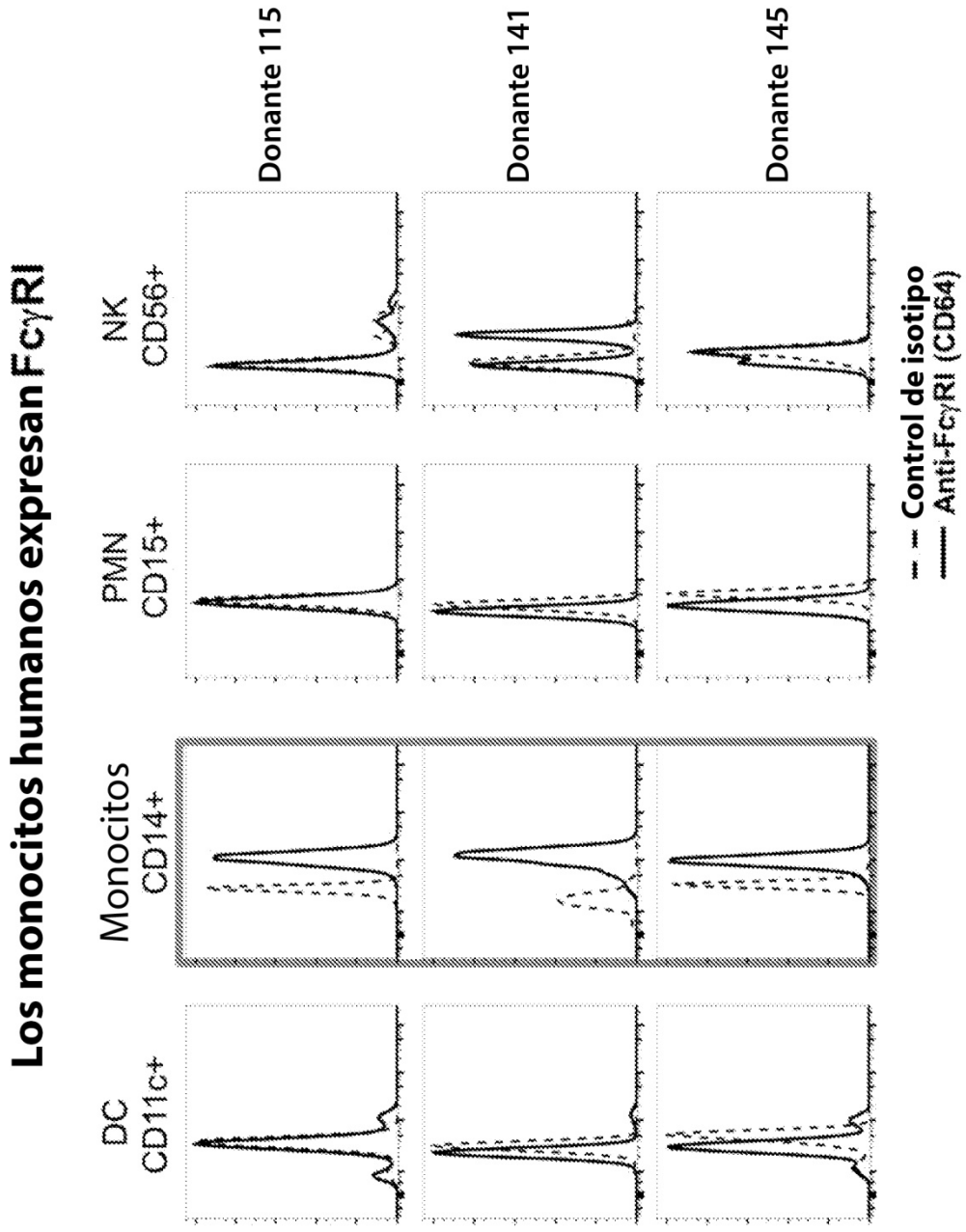
17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en donde:

(a) dicho promotor FcγRI y dicha secuencia reguladora son un promotor FcγRI y una secuencia reguladora de ser humano; o
(b) dicho promotor FcγRI y dicha secuencia reguladora son un promotor FcγRI y una secuencia reguladora de ratón.


Número de copias del gen
0
1
2
3
Ratones de estudio
Controles WT
Genotipo del alelo de ratón Fcgr1
6074-H1
6074-H2
6074-H3
6074-H4
6074-H5
6074-H6
6074-H7
6074-H8
6074-H9
6074-C
6074-C
6074-C
+/-
-/-
-/-
+/-
-/+
-/-
+/-
+/+
+/+
+/+


Número relativo de copias del gen FCGR1 humano
ΔCt
0
1
2
3
4
5
6
Controles WT
Ratones de estudio
607-C
607-C
607-C
607-H9
607-H8
607-H7
607-H6
607-H5
607-H4
607-H3
607-H2
607-H1
0
0
1
2
1
1
2
2


Número relativo de copias del gen FCGR1 humano
Número de copias del gen
0
1
2
3
1
2
2
1
1
2
1
0
0
0
6074-H1
6074-H2
6074-H3
6074-H4
6074-H5
6074-H6
6074-H7
6074-H8
6074-H9
6074-C
6074-C
6074-C
Ratones de estudio
Controles WT


Los monocitos humanos expresan FcγRI
DC CD11c+
Monocitos CD14+
PMN CD15+
NK CD56+
Donante 115
Donante 141
Donante 145
Control de isotipo
Anti-FcγRI (CD64)

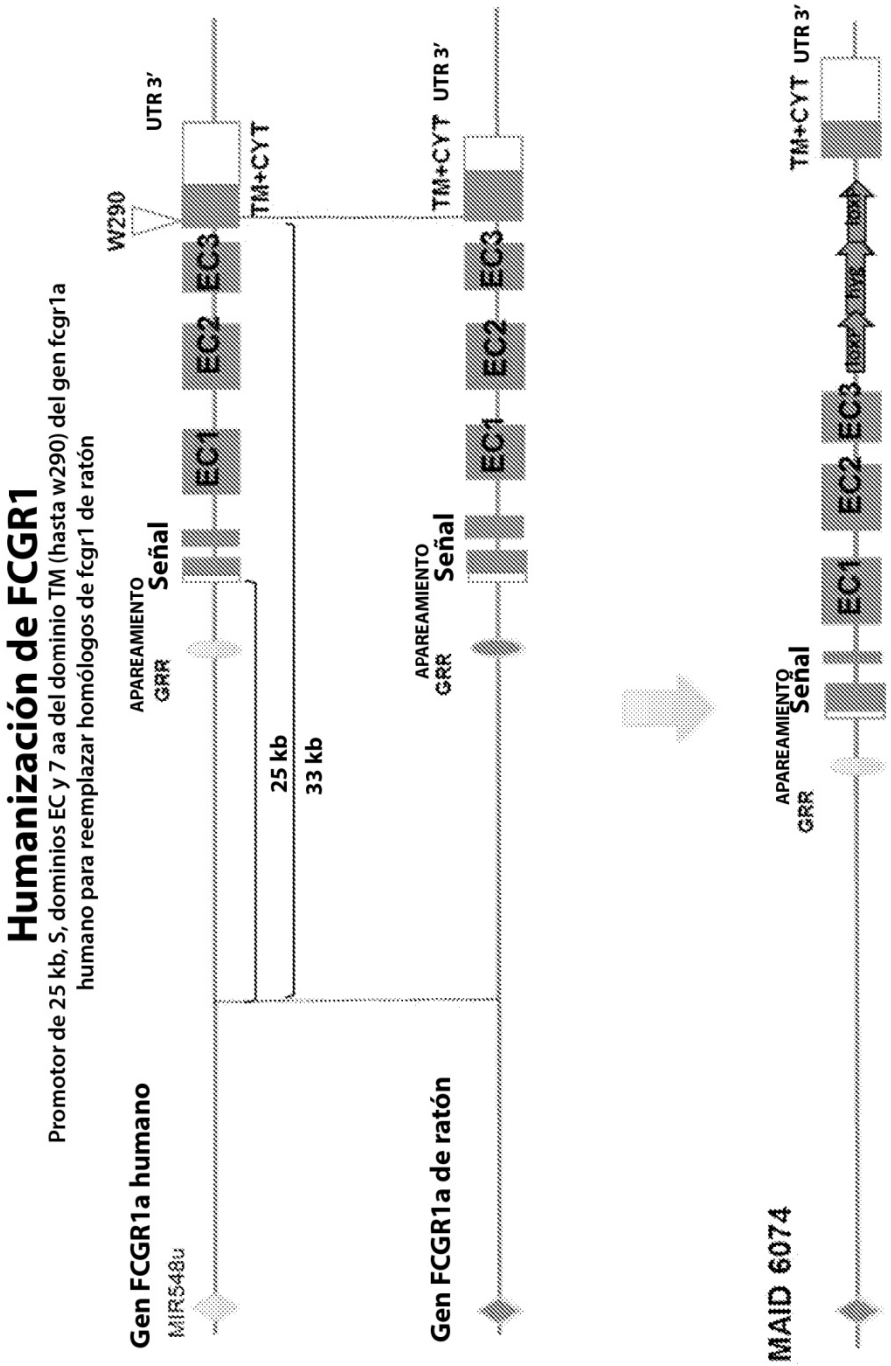

Humanización de FCGR1
Promotor de 25 kb, S, dominios EC y 7 aa del dominio TM (hasta w290) del gen fcgr1a humano para reemplazar homólogos de fcgr1 de ratón
Gen FCGR1a humano
MIR548u
APAREAMIENTO
GRR
Señal
EC1
EC2
EC3
W290
TM+CYT
UTR 3'
25 kb
33 kb
Gen FCGR1a de ratón
MAID 6074
Neo

Figura 6

MAID6074

Unión 1 (de ratón a ser humano)

TAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAGTGAGTTCCCTGTCAGC

(RATÓN) **(SER HUMANO)**

Unión 2 (de ser humano a loxp (casete neo eliminado) a ser humano):

CCGGGCTCGAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATCCTAGGGCGATCGGCCC

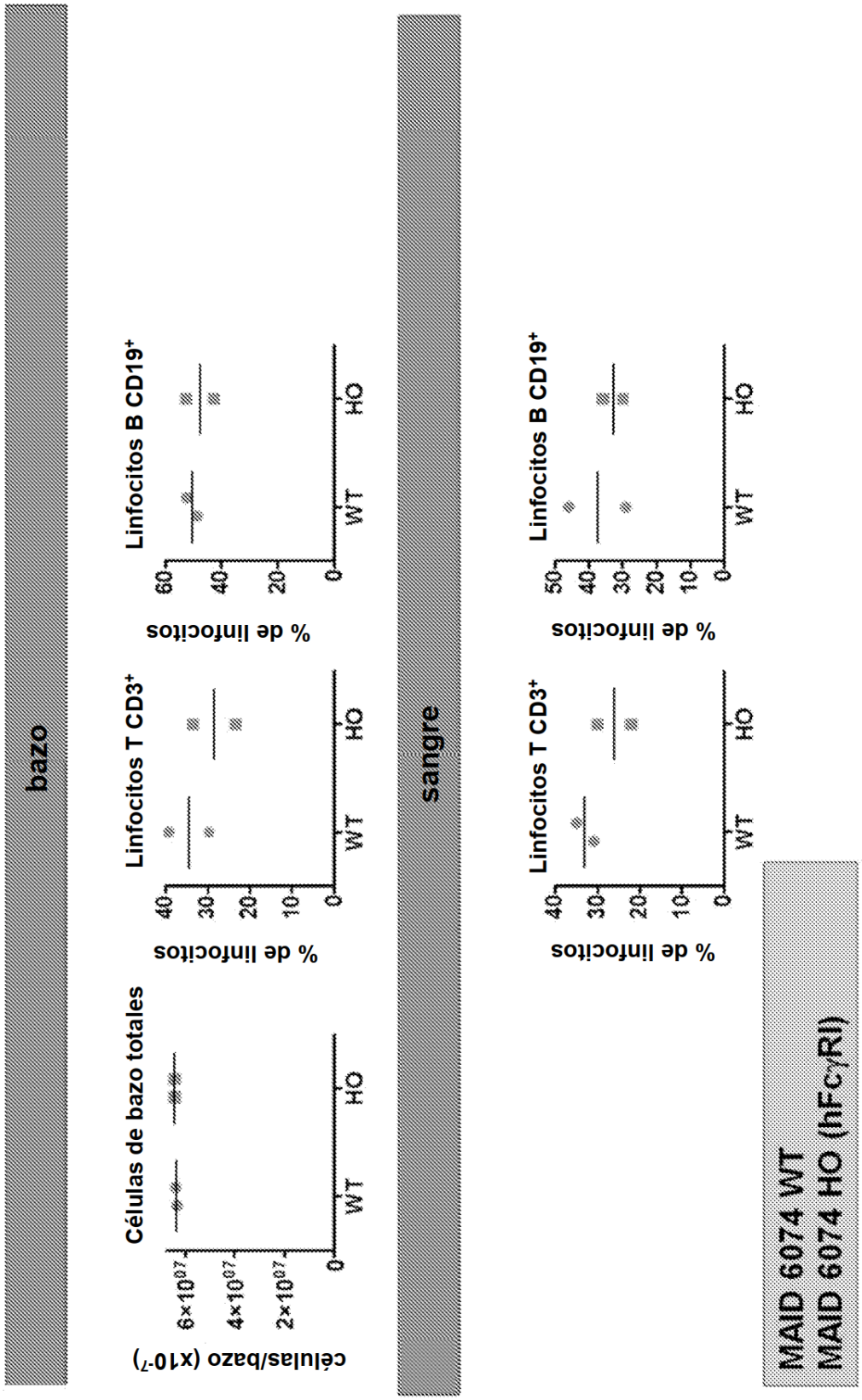
(SER HUMANO) (LOXP) **(SER HUMANO)**

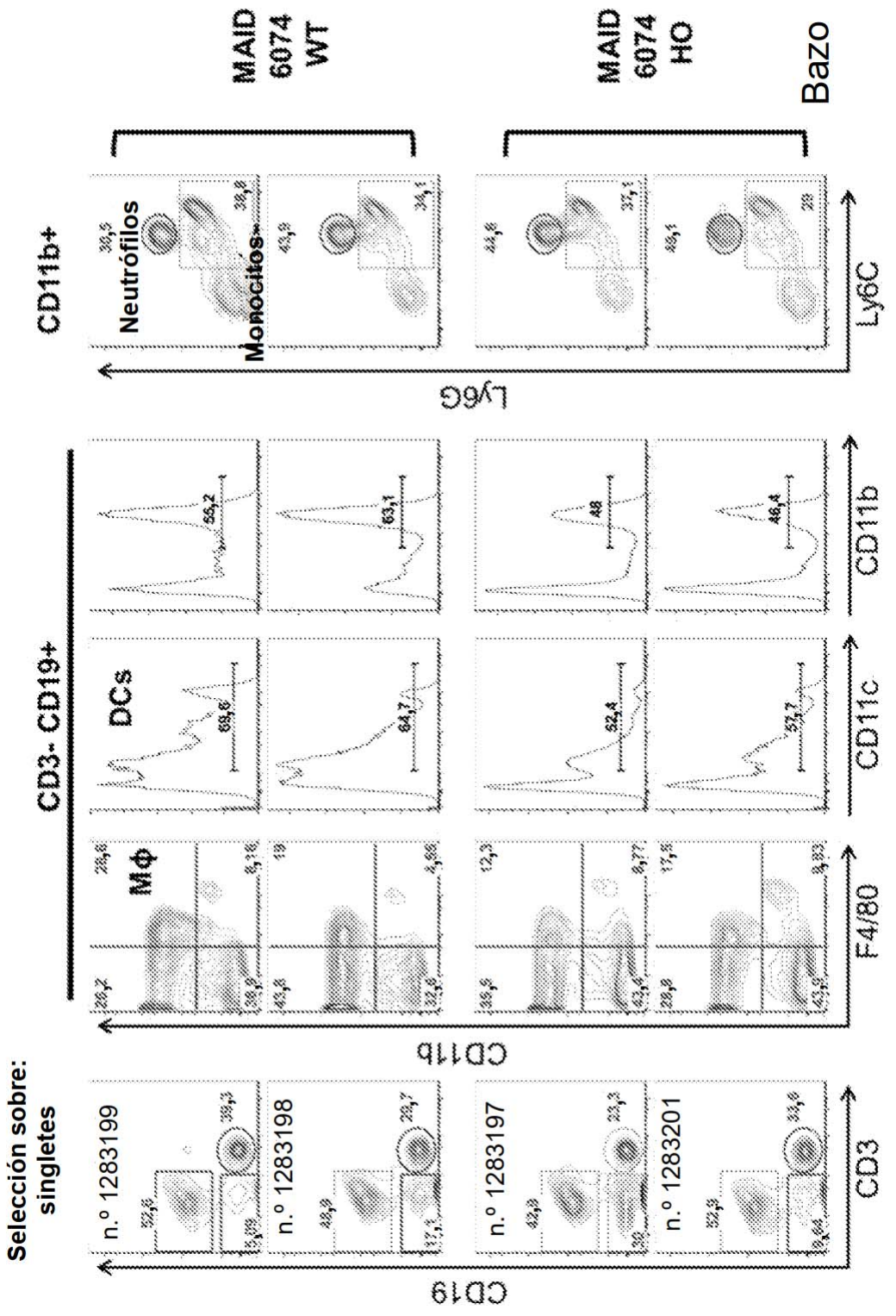
Unión 3 (de ser humano a ratón)

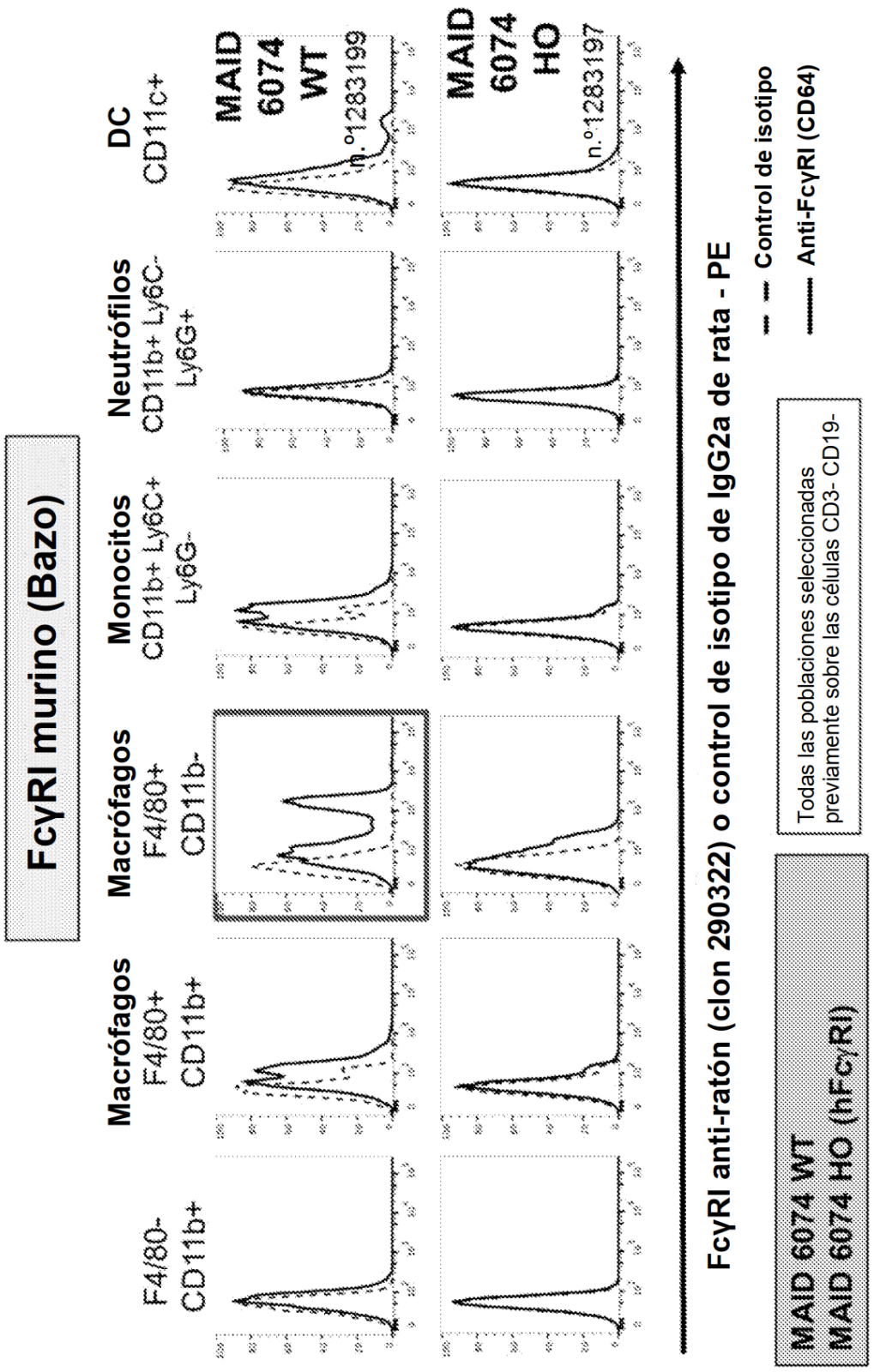
ACCAACTCCTGTCTGGTTTCACATCCTGTTTTATCTGTCAGTGGGAAT

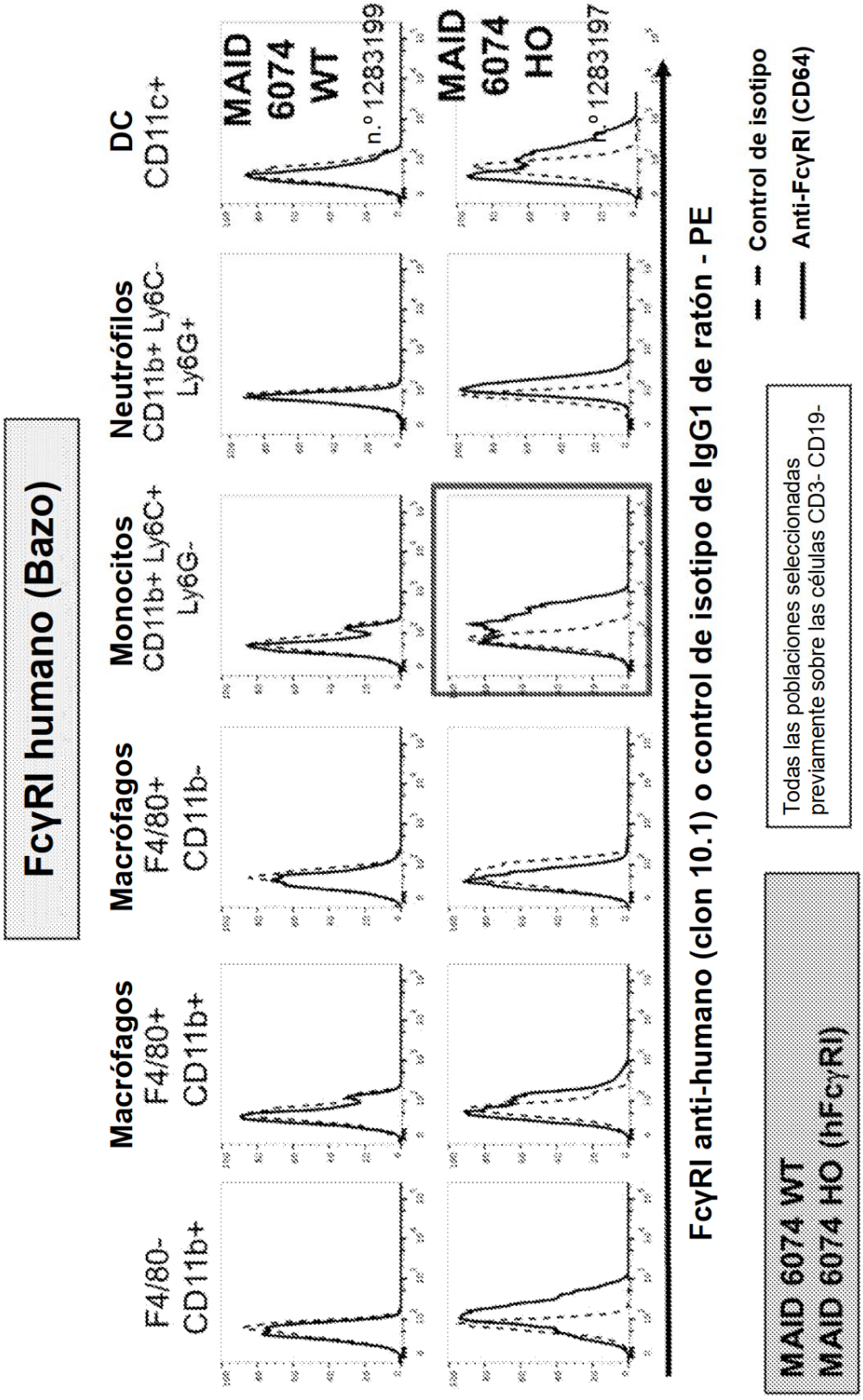
(SER HUMANO) **(RATÓN)**

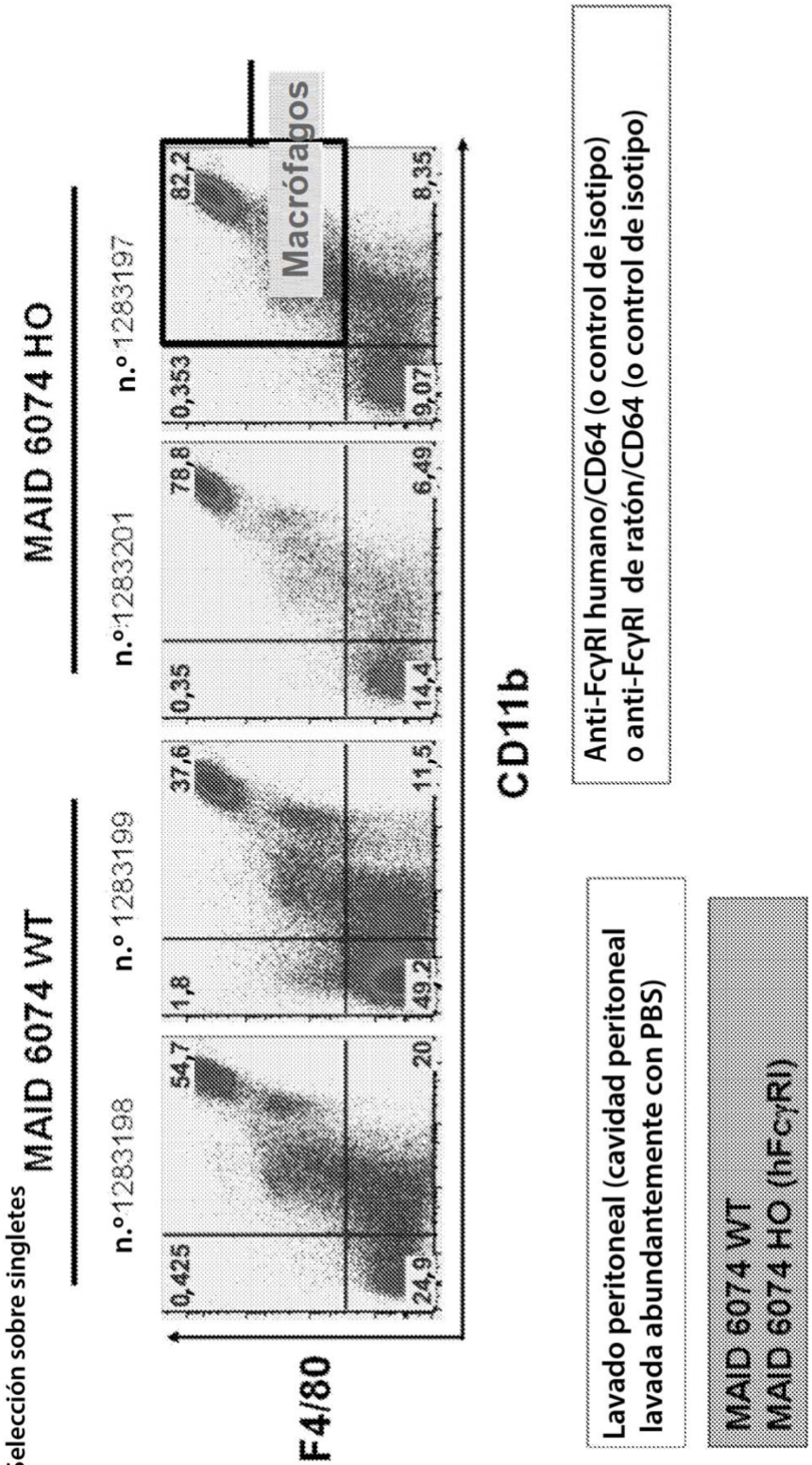
Figura 7

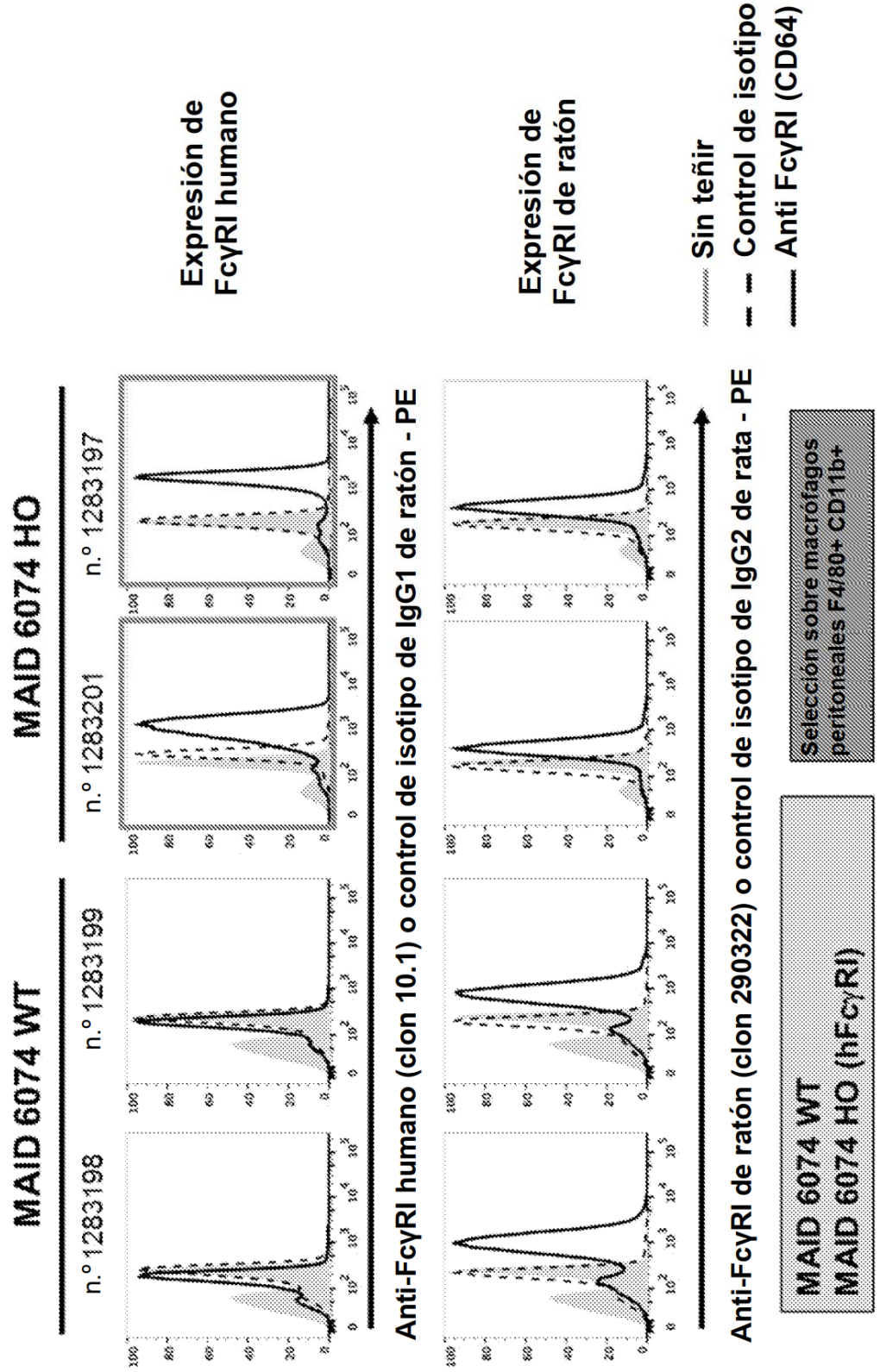

bazo
sangre
Células de bazo totales
células/bazo (x10-7)
6×10^07
4×10^07
2×10^07
0
WT
HO
Linfocitos T CD3+
% de linfocitos
40
30
20
10
0
WT
HO
Linfocitos B CD19+
% de linfocitos
60
40
20
0
WT
HO
Linfocitos T CD3+
% de linfocitos
40
30
20
10
0
WT
HO
Linfocitos B CD19+
% de linfocitos
50
40
30
20
10
0
WT
HO
MAID 6074 WT
MAID 6074 HO (hFcγRI)

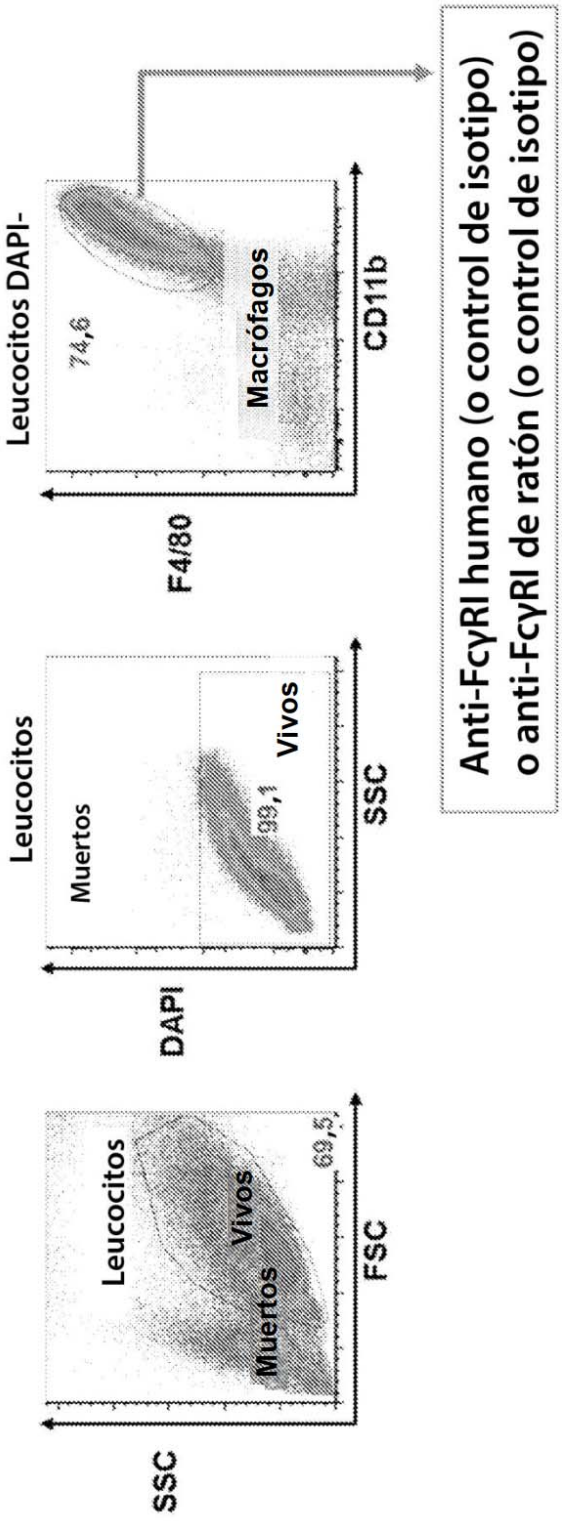

Selección sobre: singletes
n.º 1283199
n.º 1283198
n.º 1283197
n.º 1283201
CD19
CD3
CD11b
F4/80
Mϕ
CD3- CD19+
DCs
CD11c
CD11b
CD11b+
Neutrófilos
Monocitos
Ly6G
Ly6C
MAID 6074 WT
MAID 6074 HO
Bazo

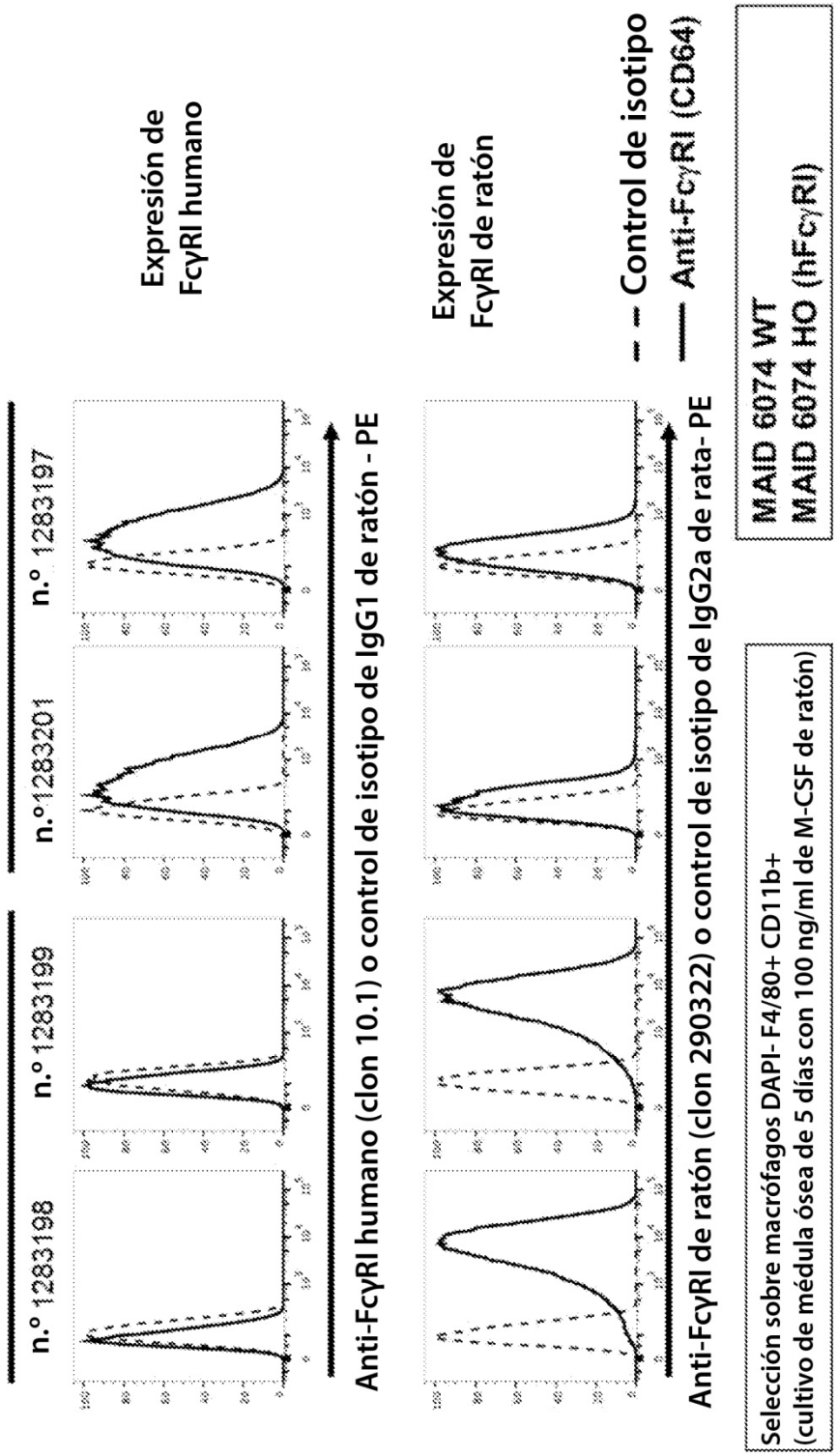

FcγRI murino (Bazo)
F4/80- CD11b+
Macrófagos F4/80+ CD11b+
Macrófagos F4/80+ CD11b-
Monocitos CD11b+ Ly6C+ Ly6G-
Neutrófilos CD11b+ Ly6C- Ly6G+
DC CD11c+
MAID 6074 WT n.º1283199
MAID 6074 HO n.º1283197
FcγRI anti-ratón (clon 290322) o control de isotipo de IgG2a de rata - PE
Control de isotipo
Anti-FcγRI (CD64)
MAID 6074 WT
MAID 6074 HO (hFcγRI)
Todas las poblaciones seleccionadas previamente sobre las células CD3- CD19-

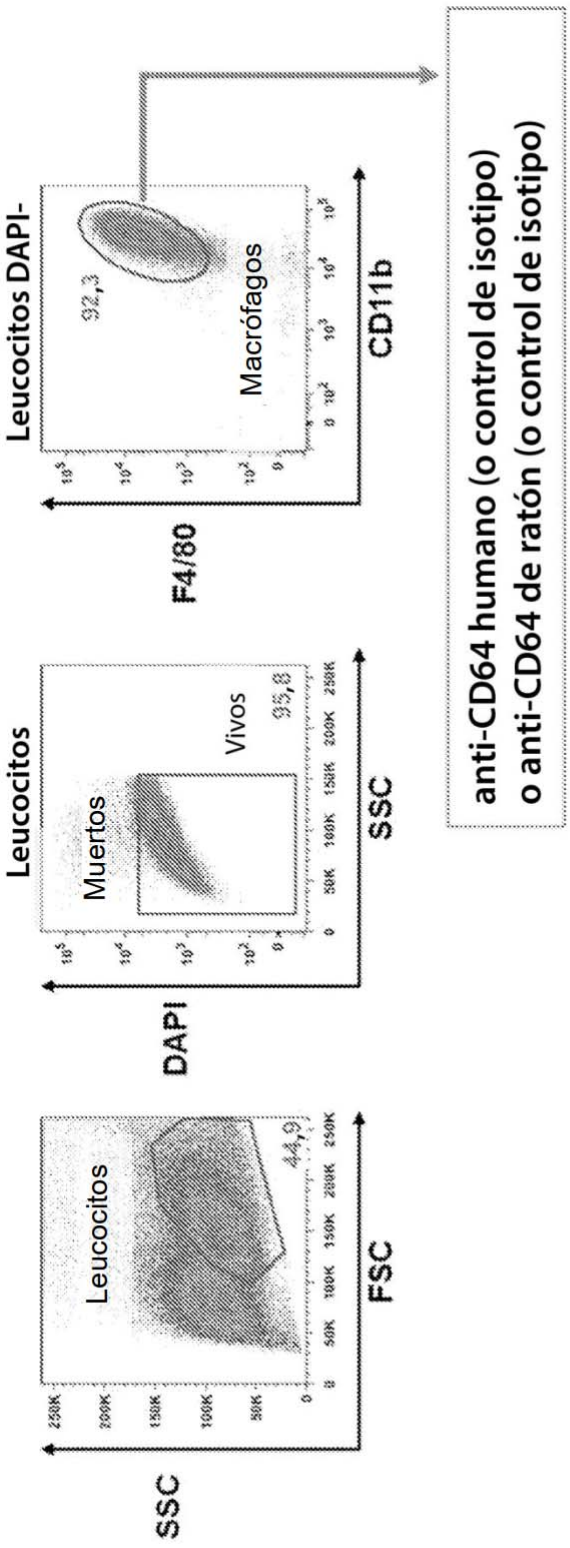

FcγRI humano (Bazo)
F4/80- CD11b+
Macrófagos F4/80+ CD11b+
Macrófagos F4/80+ CD11b-
Monocitos CD11b+ Ly6C+ Ly6G-
Neutrófilos CD11b+ Ly6C- Ly6G+
DC CD11c+
MAID 6074 WT
n.º 1283199
MAID 6074 HO
n.º 1283197
FcγRI anti-humano (clon 10.1) o control de isotipo de IgG1 de ratón - PE
Control de isotipo
Anti-FcγRI (CD64)
MAID 6074 WT
MAID 6074 HO (hFcγRI)
Todas las poblaciones seleccionadas previamente sobre las células CD3- CD19-

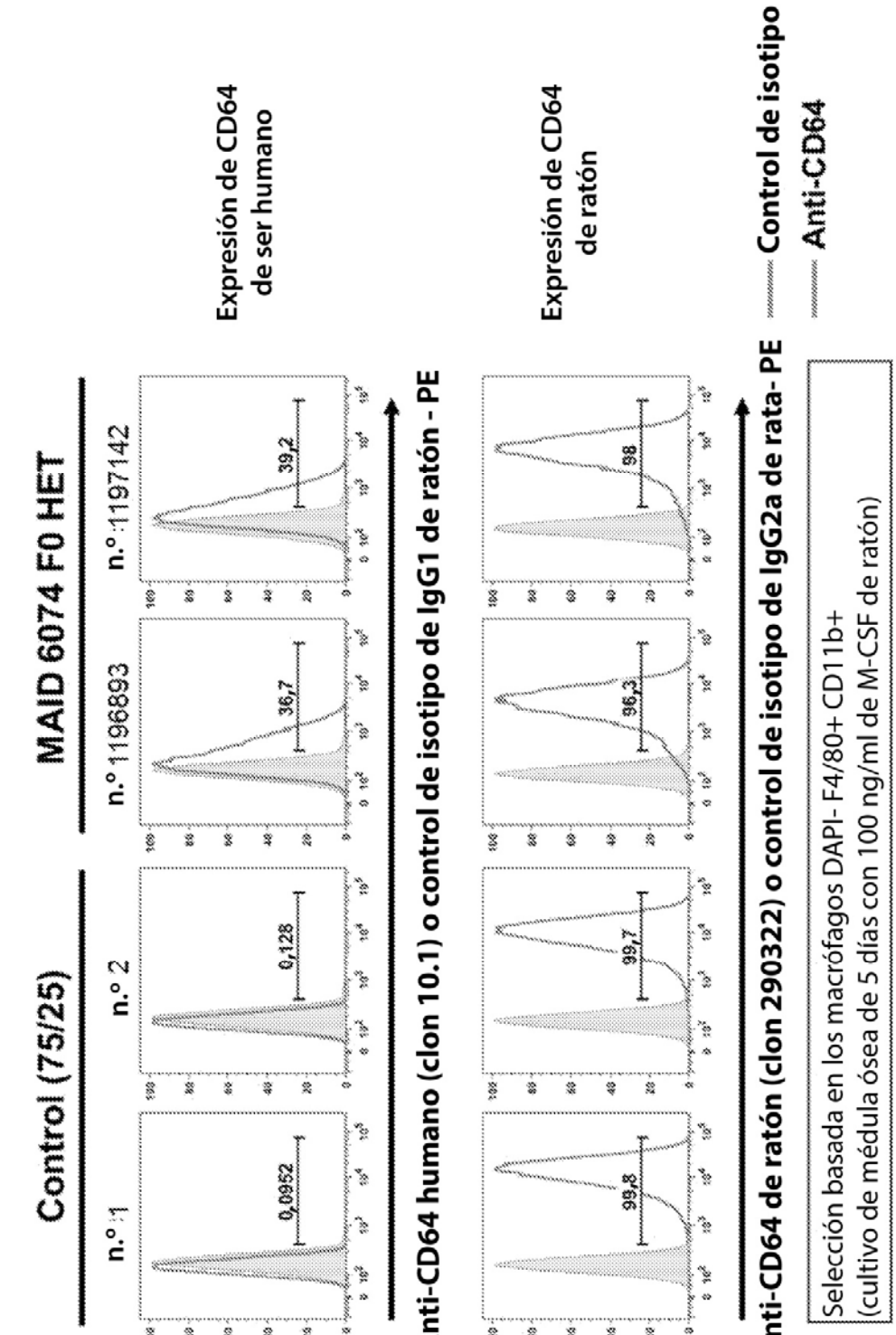

Selección sobre singletes
MAID 6074 WT
MAID 6074 HO
n.º1283198
n.º1283199
n.º1283201
n.º1283197
0,425
54,7
1,8
37,6
0,35
78,8
0,353
82,2
Macrófagos
24,9
20
49,2
11,5
14,4
6,49
9,07
8,35
F4/80
CD11b
Anti-FcγRI humano/CD64 (o control de isotipo)
o anti-FcγRI de ratón/CD64 (o control de isotipo)
Lavado peritoneal (cavidad peritoneal lavada abundantemente con PBS)
MAID 6074 WT
MAID 6074 HO (hFcγRI)

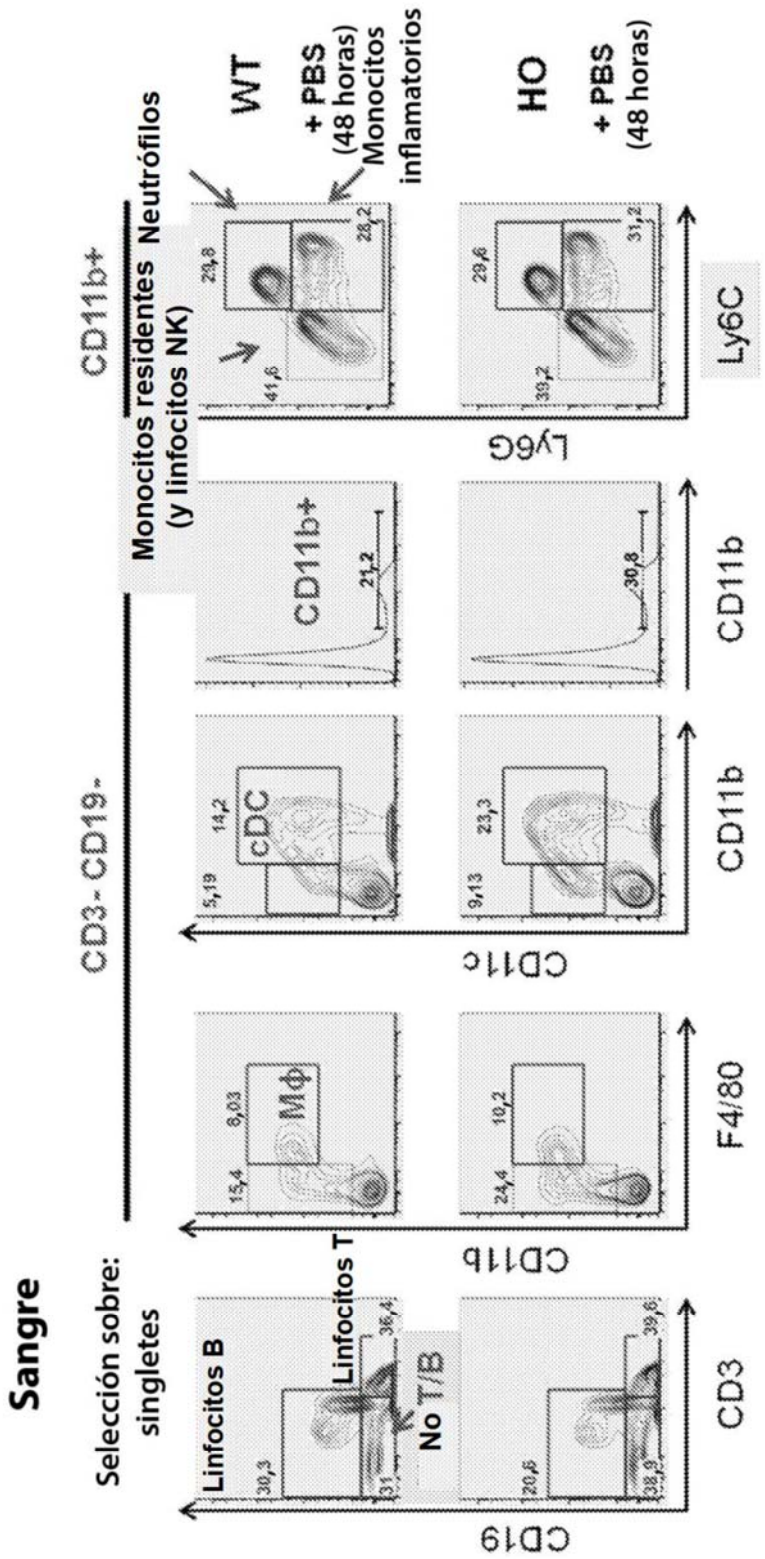

MAID 6074 WT
MAID 6074 HO
n.º 1283198
n.º 1283199
n.º 1283201
n.º 1283197
Expresión de FcγRI humano
Anti-FcγRI humano (clon 10.1) o control de isotipo de IgG1 de ratón - PE
Expresión de FcγRI de ratón
Anti-FcγRI de ratón (clon 290322) o control de isotipo de IgG2 de rata - PE
Sin teñir
Control de isotipo
Anti FcγRI (CD64)
MAID 6074 WT
MAID 6074 HO (hFcγRI)
Selección sobre macrófagos peritoneales F4/80+ CD11b+

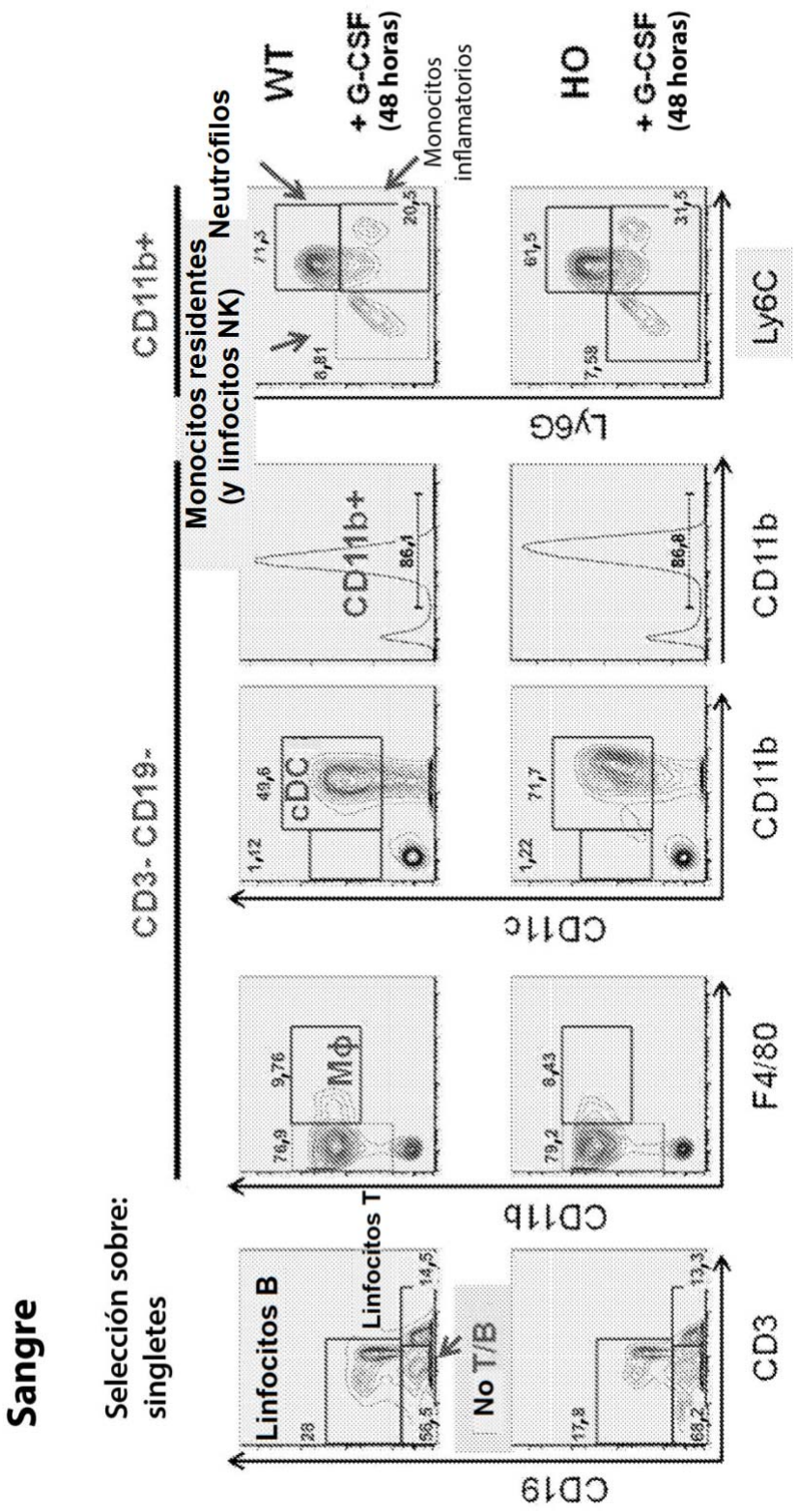

SSC
FSC
Leucocitos
Muertos
Vivos
69,5
DAPI
SSC
Leucocitos
Muertos
Vivos
99,1
F4/80
CD11b
Leucocitos DAPI-
74,6
Macrófagos
Anti-FcγRI humano (o control de isotipo)
o anti-FcγRI de ratón (o control de isotipo)

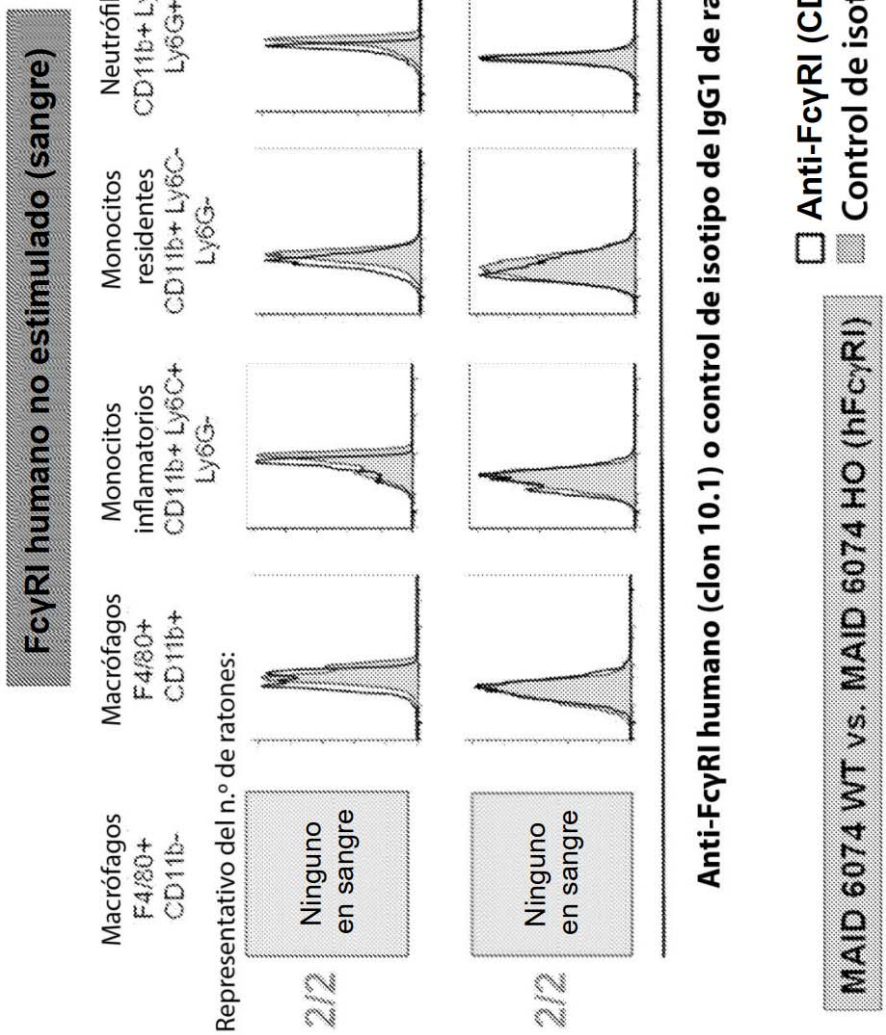

MAID 6074 WT
MAID 6074 HO
n.º 1283198
n.º 1283199
n.º1283201
n.º 1283197
Expresión de FcγRI humano
Anti-FcγRI humano (clon 10.1) o control de isotipo de IgG1 de ratón - PE
Expresión de FcγRI de ratón
Anti-FcγRI de ratón (clon 290322) o control de isotipo de IgG2a de rata- PE
- - Control de isotipo
—— Anti-FcγRI (CD64)
Selección sobre macrófagos DAPI- F4/80+ CD11b+
(cultivo de médula ósea de 5 días con 100 ng/ml de M-CSF de ratón)
MAID 6074 WT
MAID 6074 HO (hFcγRI)

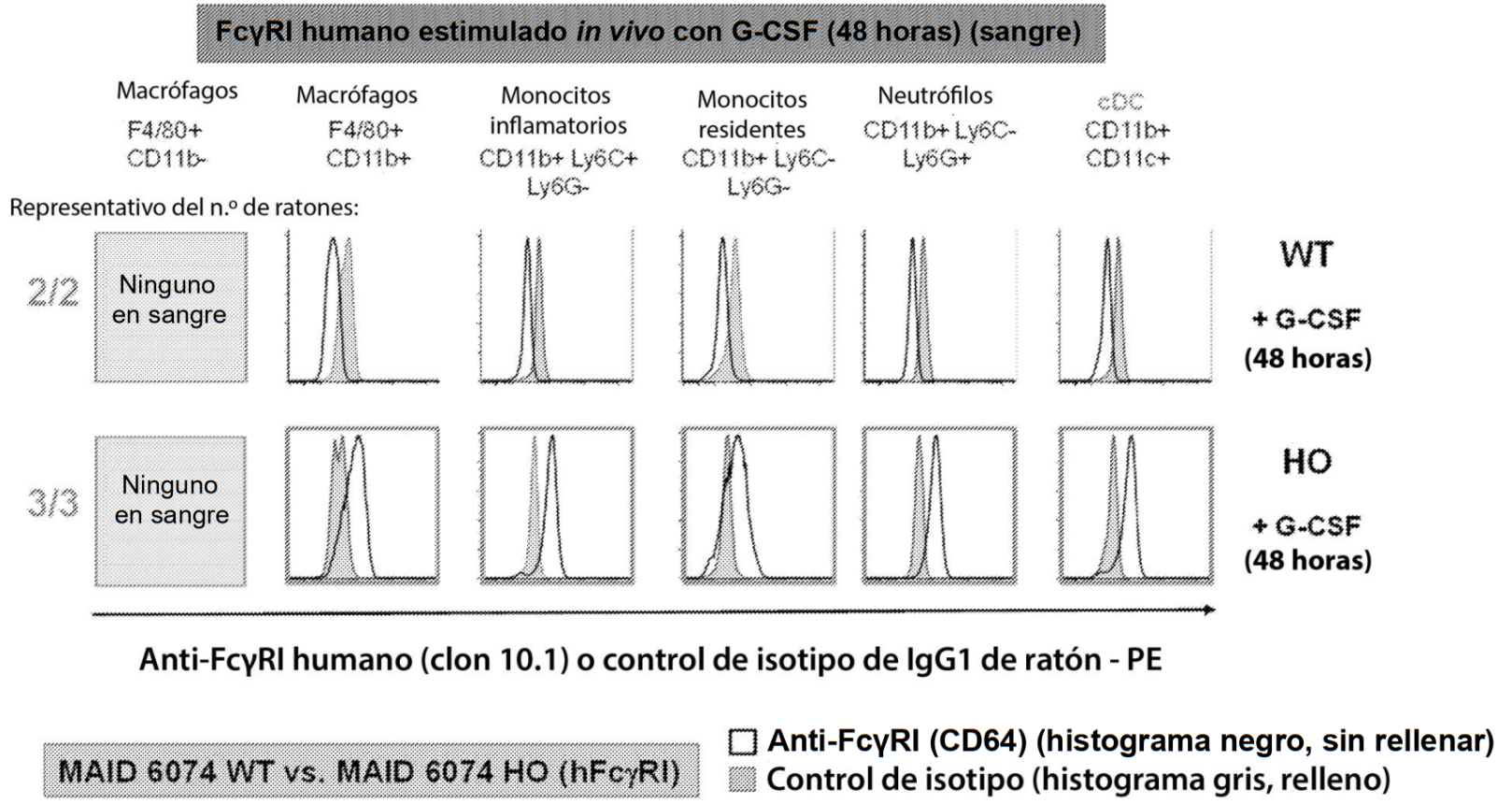

Leucocitos
SSC
FSC
44,9
DAPI
Muertos
Vivos
35,8
Leucocitos DAPI-
F4/80
CD11b
92,3
Macrófagos
anti-CD64 humano (o control de isotipo)
o anti-CD64 de ratón (o control de isotipo)
MAID 6074 (FcγRI humano) F0 het: 13 sem. de vida, machos (n= 2)
Control (75 % de B6/25 % de 129): 8 sem. de vida, machos (n = 2)

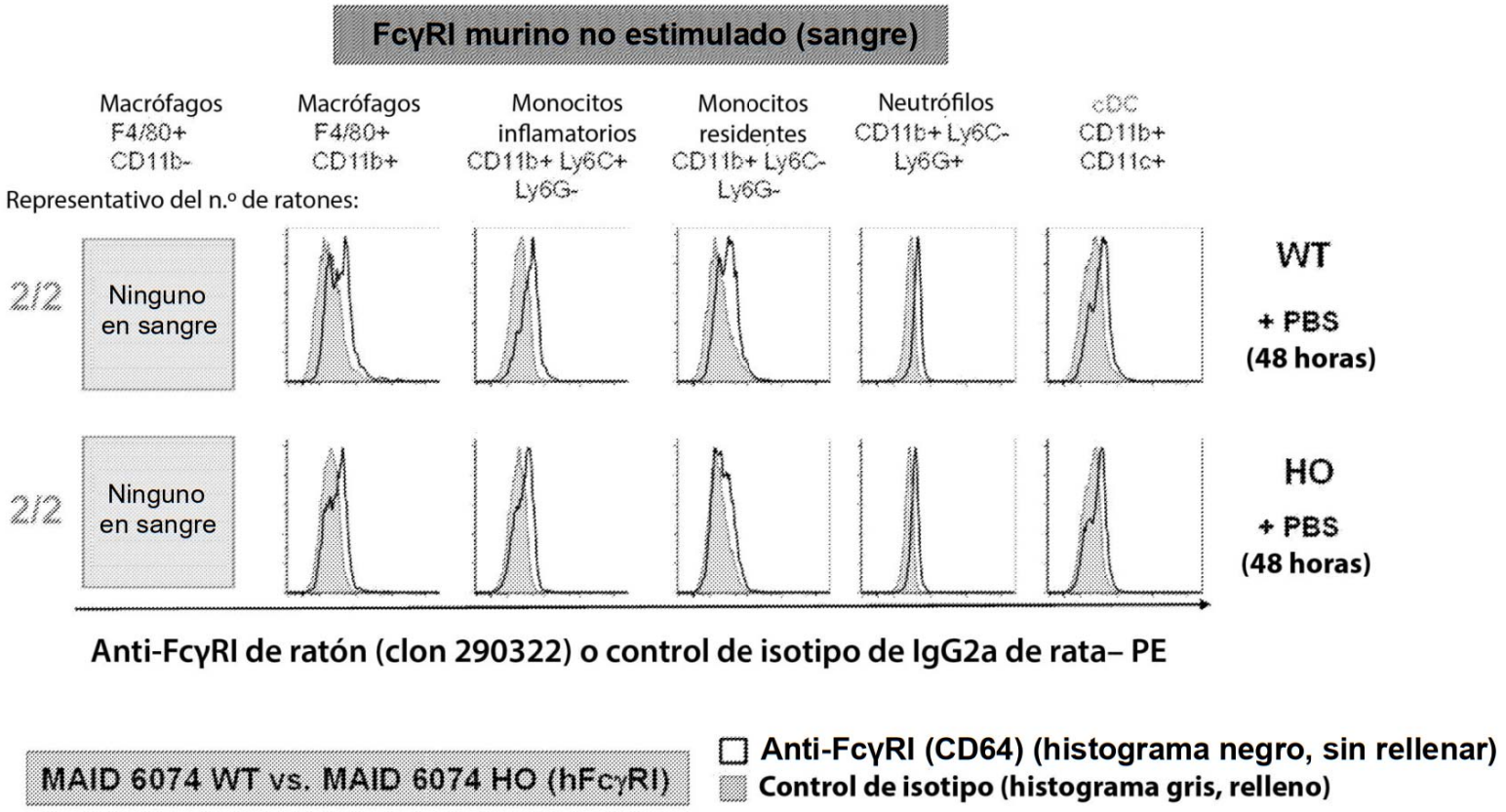

Control (75/25)
MAID 6074 F0 HET
n.º 1
n.º 2
n.º 1196893
n.º 1197142
0,0952
0,128
36,7
39,2
Expresión de CD64 de ser humano
Anti-CD64 humano (clon 10.1) o control de isotipo de IgG1 de ratón - PE
99,8
99,7
96,3
98
Expresión de CD64 de ratón
Control de isotipo
Anti-CD64
Anti-CD64 de ratón (clon 290322) o control de isotipo de IgG2a de rata- PE
Selección basada en los macrófagos DAPI- F4/80+ CD11b+
(cultivo de médula ósea de 5 días con 100 ng/ml de M-CSF de ratón)

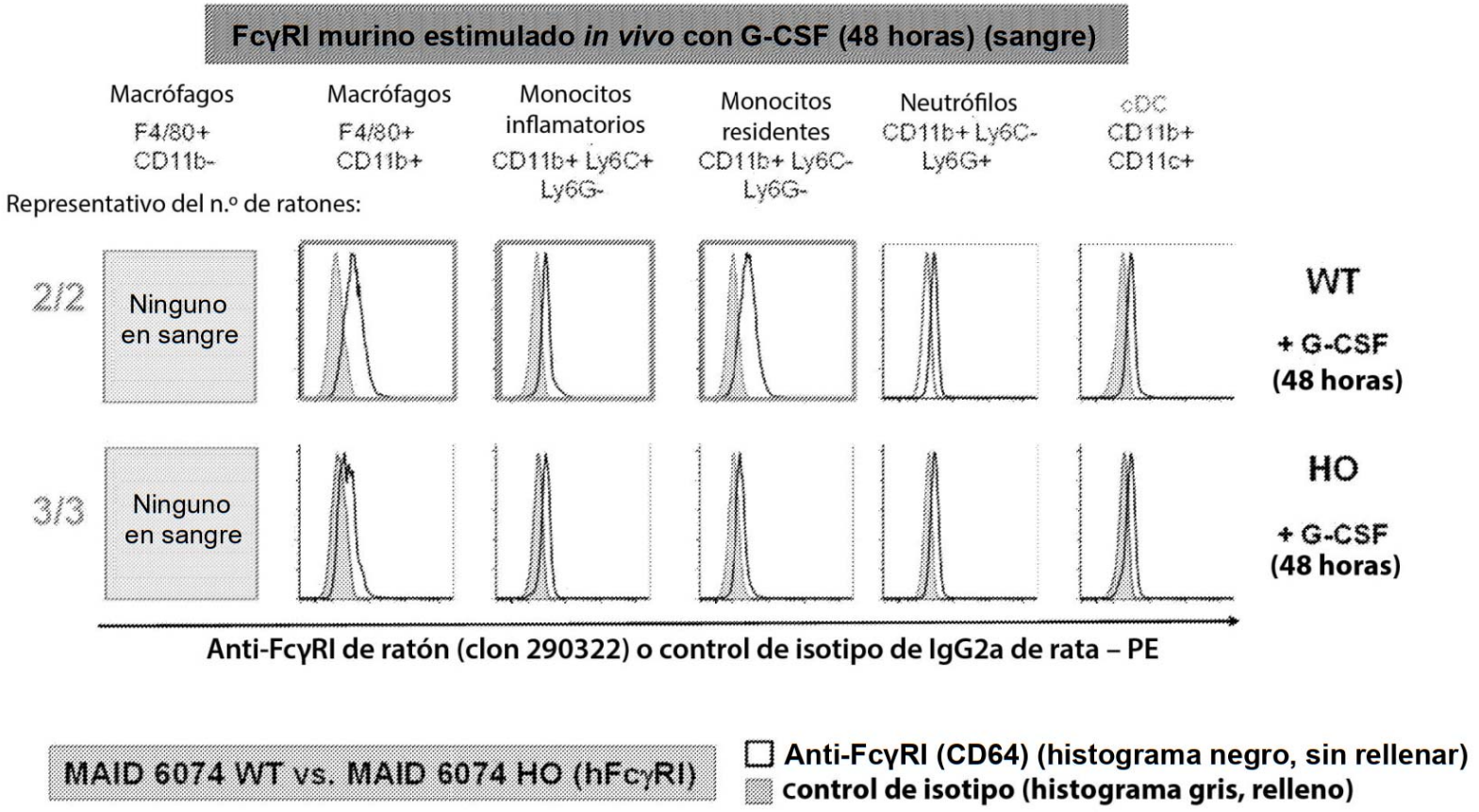

Sangre
Selección sobre: singletes
Linfocitos B
Linfocitos T
No T/B
CD19
CD3
CD3- CD19-
CD11b+
Monocitos residentes (y linfocitos NK)
Neutrófilos
CD11b
F4/80
Mϕ
CD11c
cDC
CD11b
CD11b+
Ly6G
WT
+ PBS (48 horas)
Monocitos inflamatorios
HO
+ PBS (48 horas)
Ly6C

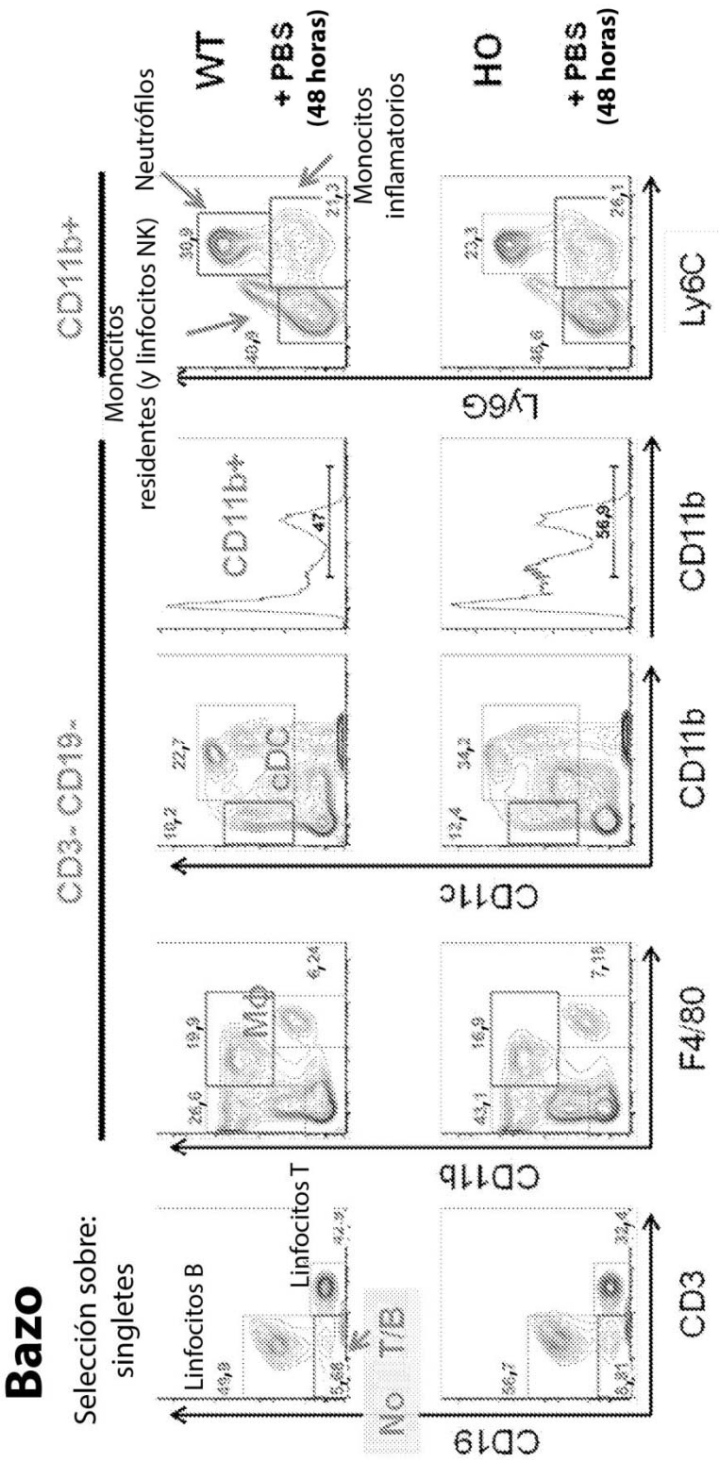

Sangre
Selección sobre: singletes
CD3- CD19-
CD11b+
Monocitos residentes (y linfocitos NK)
Neutrófilos
Linfocitos B
Linfocitos T
No T/B
Mϕ
cDC
CD19
CD3
CD11b
F4/80
CD11c
CD11b
Ly6G
Ly6C
WT
+ G-CSF (48 horas)
Monocitos inflamatorios
HO
+ G-CSF (48 horas)

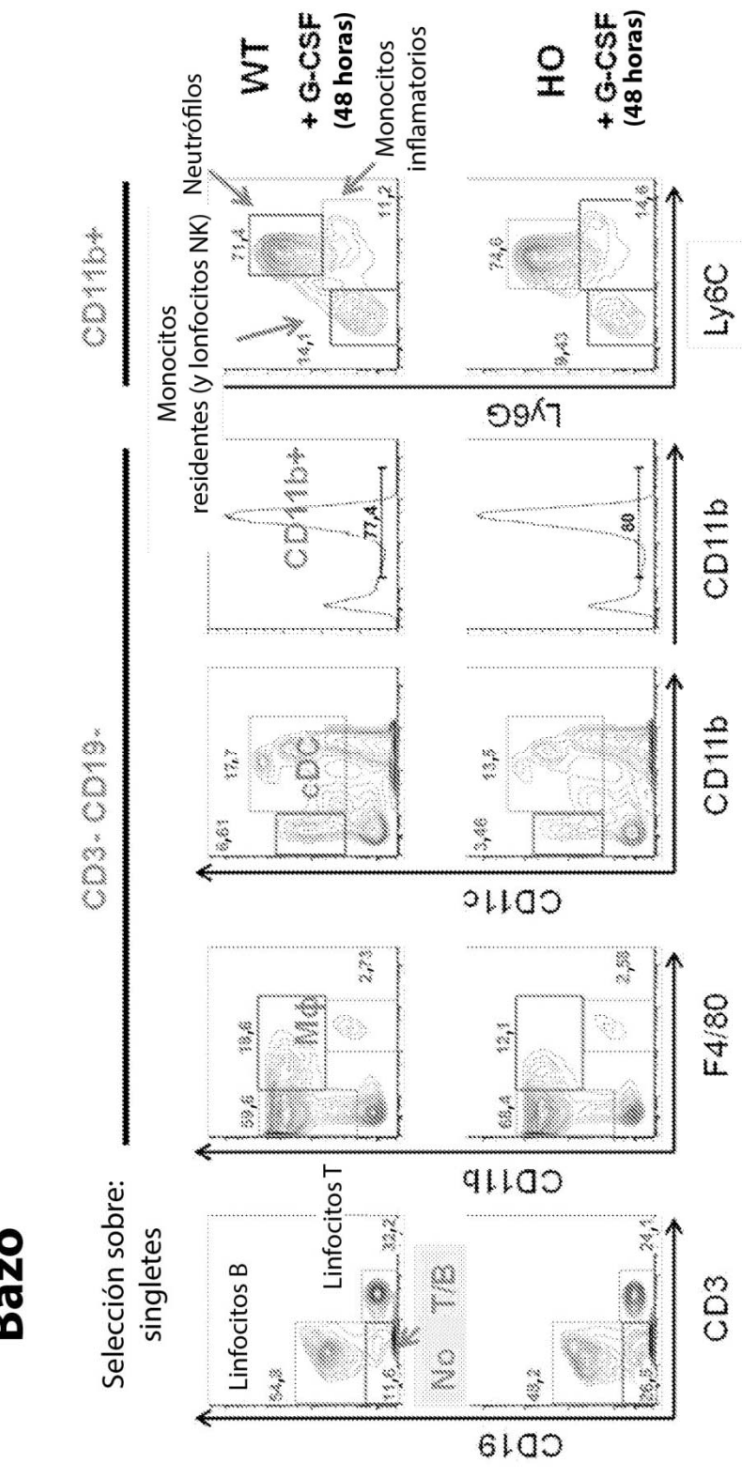

FcγRI humano no estimulado (sangre)
Macrófagos F4/80+ CD11b-
Macrófagos F4/80+ CD11b+
Monocitos inflamatorios CD11b+ Ly6C+ Ly6G-
Monocitos residentes CD11b+ Ly6C- Ly6G-
Neutrófilos CD11b+ Ly6C- Ly6G+
cDC CD11b+ CD11c+
Representativo del n.º de ratones:
2/2
Ninguno en sangre
2/2
Ninguno en sangre
WT + PBS (48 horas)
HO + PBS (48 horas)
Anti-FcγRI humano (clon 10.1) o control de isotipo de IgG1 de ratón – PE
Anti-FcγRI (CD64) (histograma negro, sin rellenar)
Control de isotipo (histograma gris, relleno)
MAID 6074 WT vs. MAID 6074 HO (hFcγRI)

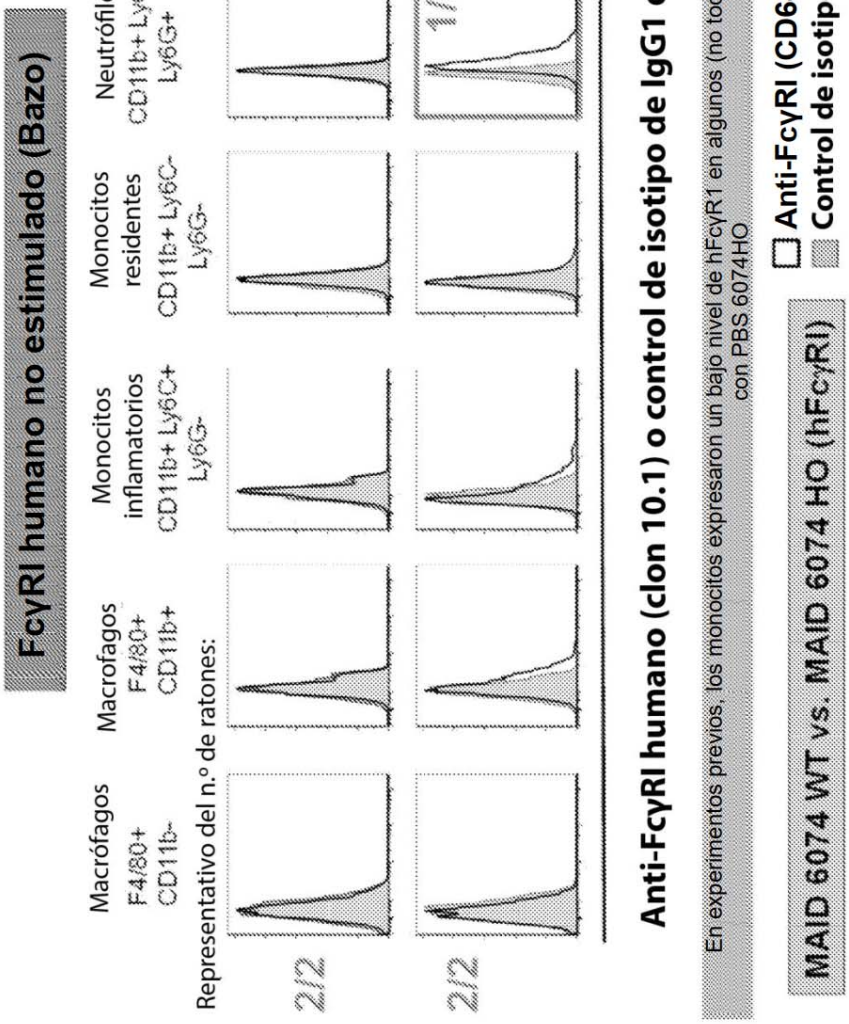

FcγRI humano estimulado *in vivo* con G-CSF (48 horas) (sangre)
Macrófagos F4/80+ CD11b-
Macrófagos F4/80+ CD11b+
Monocitos inflamatorios CD11b+ Ly6C+ Ly6G-
Monocitos residentes CD11b+ Ly6C- Ly6G-
Neutrófilos CD11b+ Ly6C- Ly6G+
cDC CD11b+ CD11c+
Representativo del n.º de ratones:
2/2
Ninguno en sangre
WT
+ G-CSF (48 horas)
3/3
Ninguno en sangre
HO
+ G-CSF (48 horas)
Anti-FcγRI humano (clon 10.1) o control de isotipo de IgG1 de ratón - PE
MAID 6074 WT vs. MAID 6074 HO (hFcγRI)
Anti-FcγRI (CD64) (histograma negro, sin rellenar)
Control de isotipo (histograma gris, relleno)

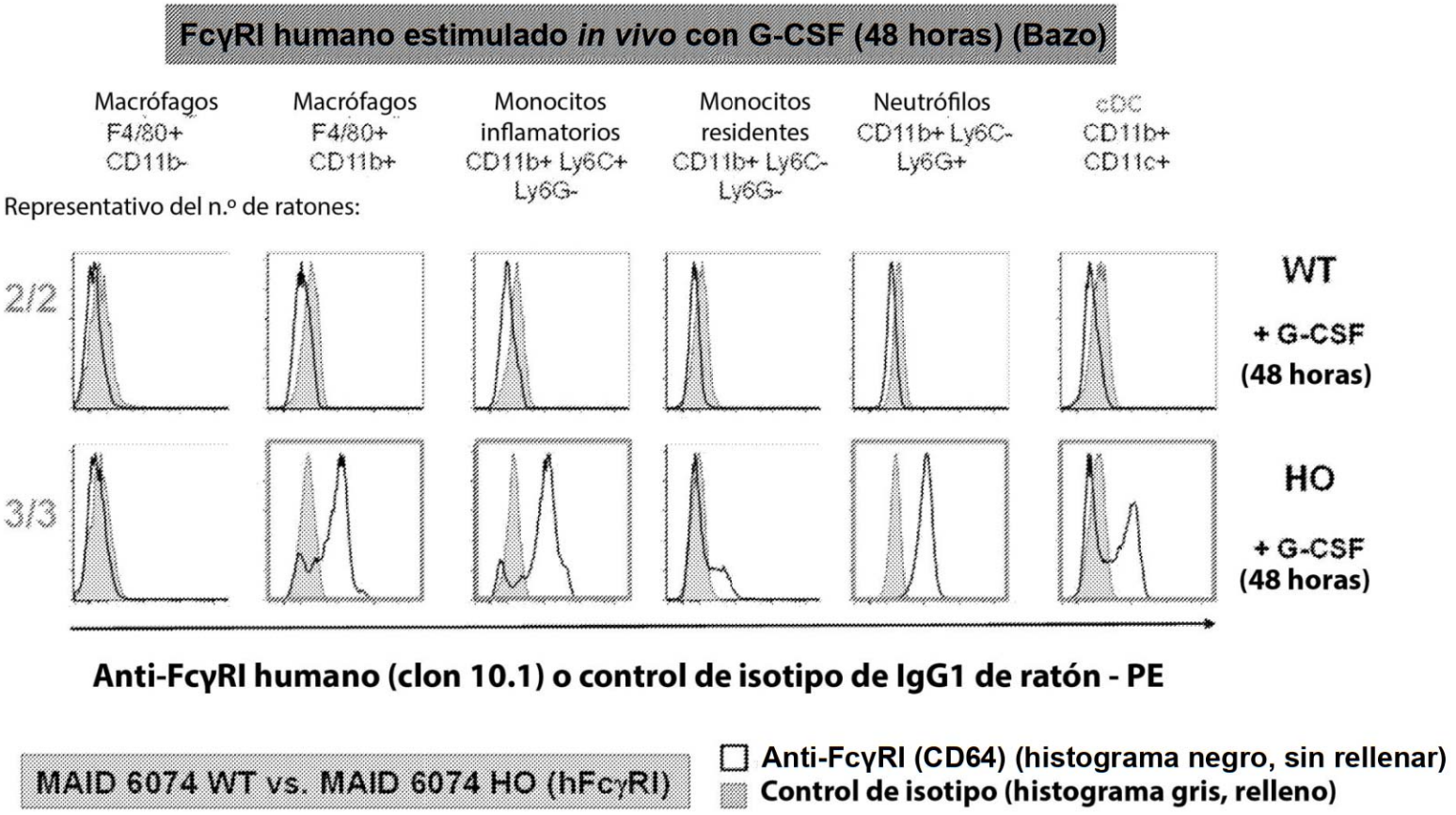

FcγRI murino no estimulado (sangre)
Macrófagos F4/80+ CD11b-
Macrófagos F4/80+ CD11b+
Monocitos inflamatorios CD11b+ Ly6C+ Ly6G-
Monocitos residentes CD11b+ Ly6C- Ly6G-
Neutrófilos CD11b+ Ly6C- Ly6G+
cDC CD11b+ CD11c+
Representativo del n.º de ratones:
2/2
Ninguno en sangre
WT
+ PBS (48 horas)
2/2
Ninguno en sangre
HO
+ PBS (48 horas)
Anti-FcγRI de ratón (clon 290322) o control de isotipo de IgG2a de rata– PE
MAID 6074 WT vs. MAID 6074 HO (hFcγRI)
Anti-FcγRI (CD64) (histograma negro, sin rellenar)
Control de isotipo (histograma gris, relleno)

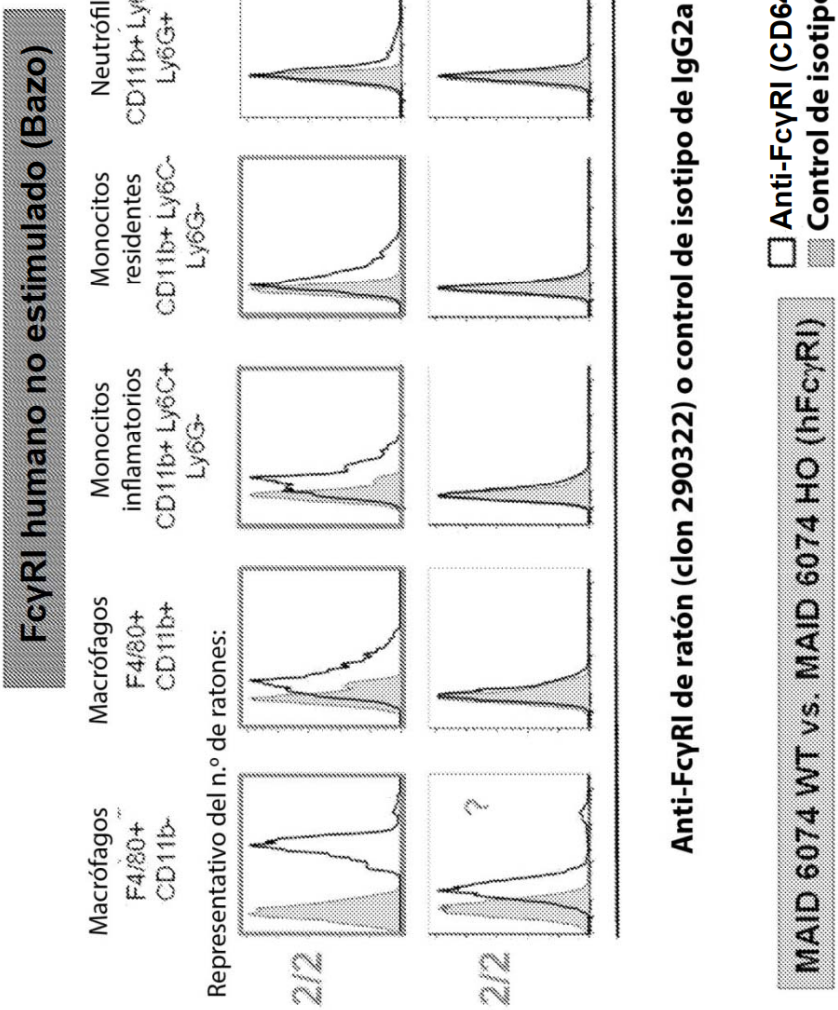

FcγRI murino estimulado *in vivo* con G-CSF (48 horas) (sangre)
Macrófagos F4/80+ CD11b-
Macrófagos F4/80+ CD11b+
Monocitos inflamatorios CD11b+ Ly6C+ Ly6G-
Monocitos residentes CD11b+ Ly6C- Ly6G-
Neutrófilos CD11b+ Ly6C- Ly6G+
cDC CD11b+ CD11c+
Representativo del n.º de ratones:
2/2
Ninguno en sangre
3/3
Ninguno en sangre
WT
+ G-CSF (48 horas)
HO
+ G-CSF (48 horas)
Anti-FcγRI de ratón (clon 290322) o control de isotipo de IgG2a de rata – PE
MAID 6074 WT vs. MAID 6074 HO (hFcγRI)
Anti-FcγRI (CD64) (histograma negro, sin rellenar)
control de isotipo (histograma gris, relleno)

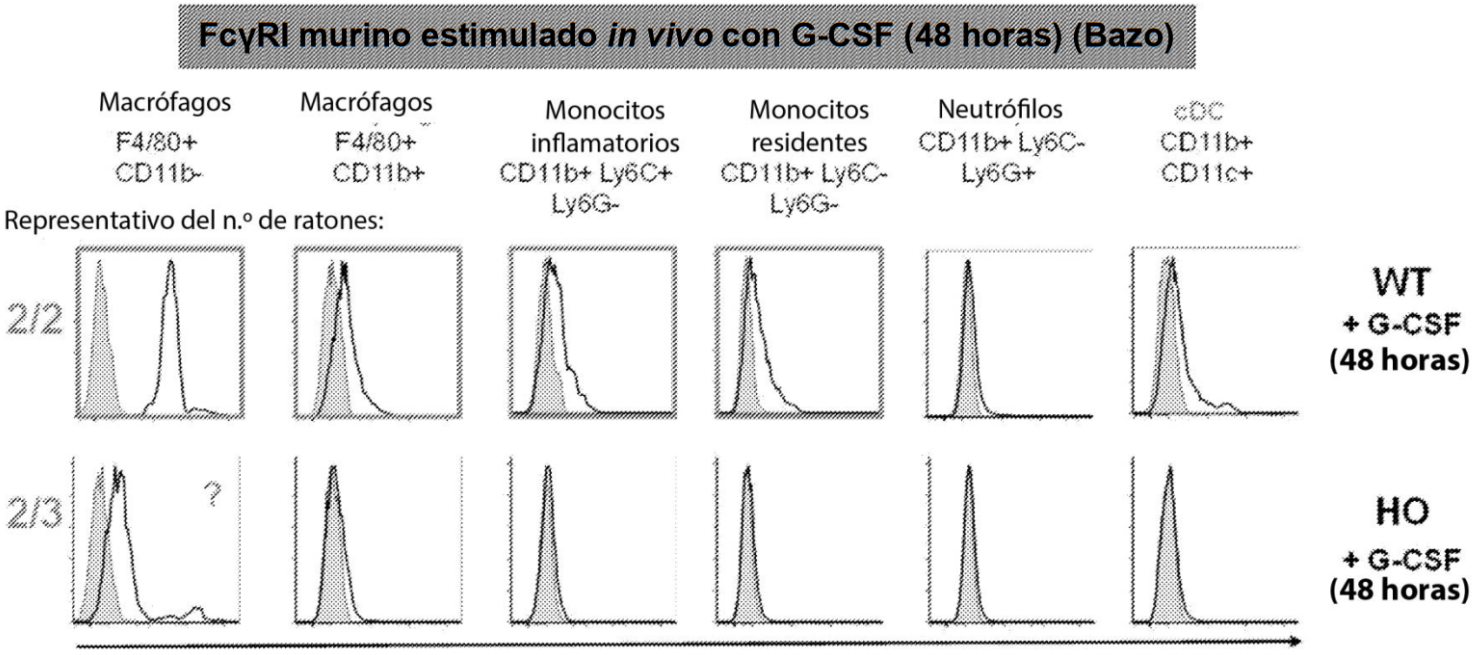

Bazo
Selección sobre: singletes
CD19
CD3
No T/B
Linfocitos B
Linfocitos T
CD3- CD19-
CD11b+
CD11b
F4/80
MΦ
CD11c
cDC
CD11b
CD11b+
Monocitos residentes (y linfocitos NK)
Neutrófilos
Monocitos inflamatorios
Ly6G
Ly6C
WT
+ PBS (48 horas)
HO
+ PBS (48 horas)


Bazo
Selección sobre: singletes
CD3- CD19-
CD11b+
Linfocitos B
Linfocitos T
NO T/B
CD19
CD3
CD11b
F4/80
CD11c
CD11b
Monocitos residentes (y lonfocitos NK)
Neutrófilos
Monocitos inflamatorios
WT
+ G-CSF (48 horas)
HO
+ G-CSF (48 horas)
Ly6G
Ly6C


FcγRI humano no estimulado (Bazo)
Macrófagos F4/80+ CD11b-
Macrofagos F4/80+ CD11b+
Monocitos inflamatorios CD11b+ Ly6C+ Ly6G-
Monocitos residentes CD11b+ Ly6C- Ly6G-
Neutrófilos CD11b+ Ly6C- Ly6G+
cDC CD11b+ CD11c+
Representativo del n.º de ratones:
2/2
2/2
1/2^
WT + PBS (48 horas)
HO + PBS (48 horas)
Anti-FcγRI humano (clon 10.1) o control de isotipo de IgG1 de ratón - PE
En experimentos previos, los monocitos expresaron un bajo nivel de hFcγR1 en algunos (no todos) los ratones no tratados/tratados con PBS 6074HO
MAID 6074 WT vs. MAID 6074 HO (hFcγRI)
Anti-FcγRI (CD64) (histograma negro, sin rellenar)
Control de isotipo (histograma gris, relleno)

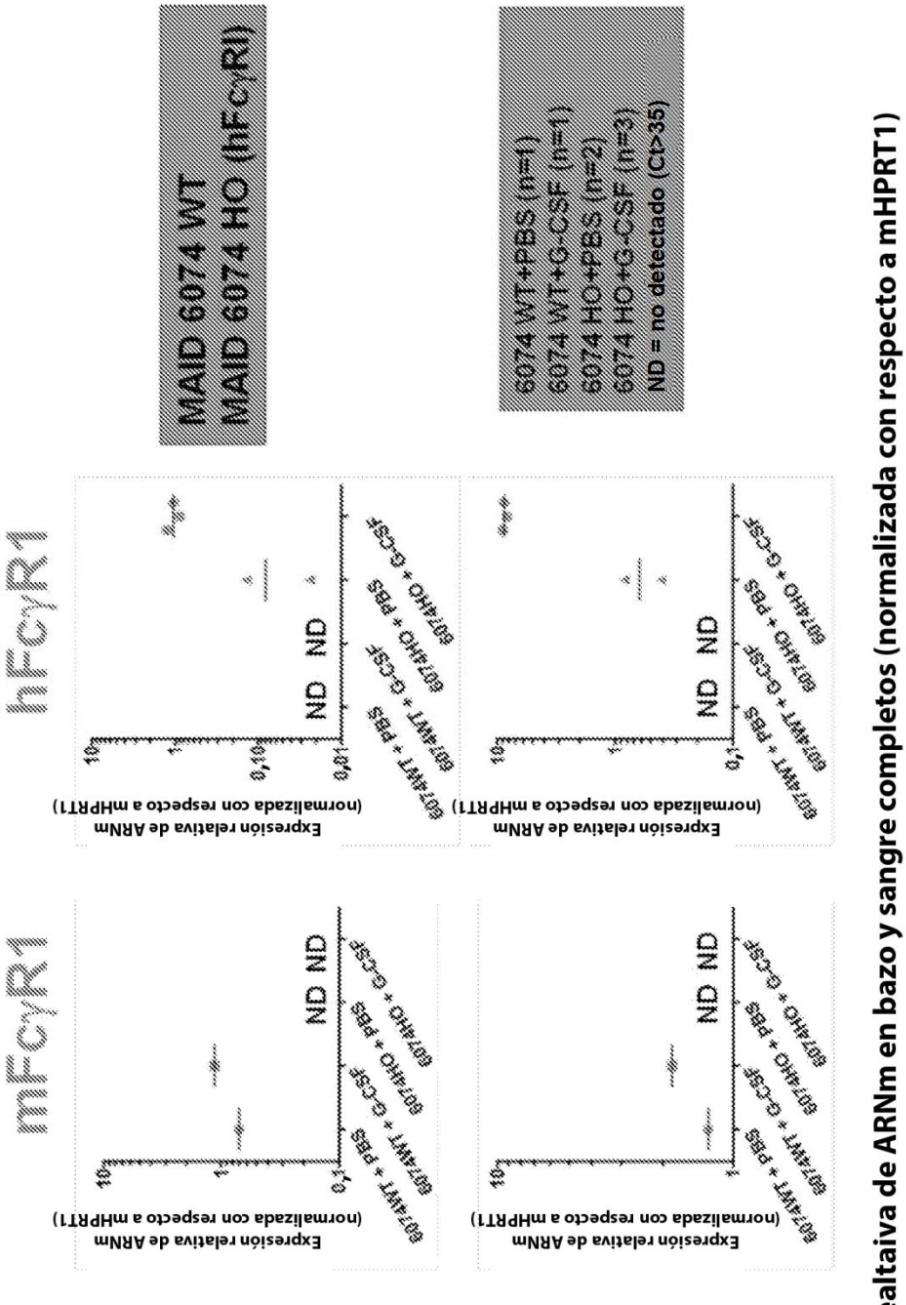

FcγRI humano estimulado *in vivo* con G-CSF (48 horas) (Bazo)
Macrófagos F4/80+ CD11b-
Macrófagos F4/80+ CD11b+
Monocitos inflamatorios CD11b+ Ly6C+ Ly6G-
Monocitos residentes CD11b+ Ly6C- Ly6G-
Neutrófilos CD11b+ Ly6C- Ly6G+
cDC CD11b+ CD11c+
Representativo del n.º de ratones:
2/2
3/3
WT
+ G-CSF (48 horas)
HO
+ G-CSF (48 horas)
Anti-FcγRI humano (clon 10.1) o control de isotipo de IgG1 de ratón - PE
MAID 6074 WT vs. MAID 6074 HO (hFcγRI)
Anti-FcγRI (CD64) (histograma negro, sin rellenar)
Control de isotipo (histograma gris, relleno)


FcγRI humano no estimulado (Bazo)
Macrófagos F4/80+ CD11b-
Macrófagos F4/80+ CD11b+
Monocitos inflamatorios CD11b+ Ly6C+ Ly6G-
Monocitos residentes CD11b+ Ly6C- Ly6G-
Neutrófilos CD11b+ Ly6C- Ly6G+
cDC CD11b+ CD11c+
Representativo del n.º de ratones:
2/2
2/2
WT + PBS (48 horas)
HO + PBS (48 horas)
Anti-FcγRI de ratón (clon 290322) o control de isotipo de IgG2a de rata - PE
MAID 6074 WT vs. MAID 6074 HO (hFcγRI)
Anti-FcγRI (CD64) (histograma negro, sin rellenar)
Control de isotipo (histograma gris, relleno)

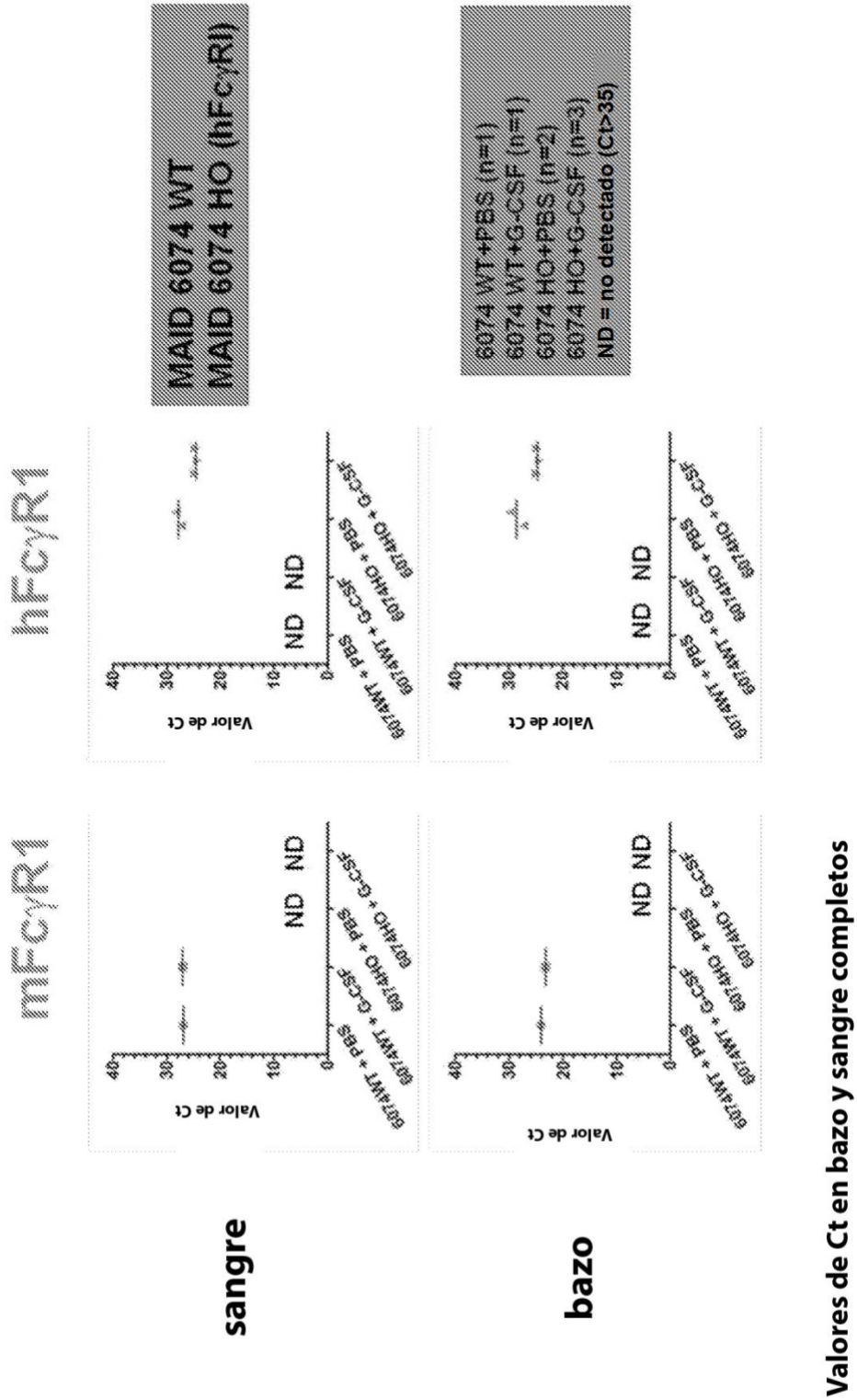

FcγRI murino estimulado *in vivo* con G-CSF (48 horas) (Bazo)
Macrófagos F4/80+ CD11b-
Macrófagos F4/80+ CD11b+
Monocitos inflamatorios CD11b+ Ly6C+ Ly6G-
Monocitos residentes CD11b+ Ly6C- Ly6G-
Neutrófilos CD11b+ Ly6C- Ly6G+
cDC CD11b+ CD11c+
Representativo del n.º de ratones:
2/2
2/3
?
WT + G-CSF (48 horas)
HO + G-CSF (48 horas)
Anti-FcγRI de ratón (clon 290322) o control de isotipo de IgG2a de rata - PE
MAID 6074 WT vs. MAID 6074 HO (hFcγRI)
Anti-FcγRI (CD64) (histograma negro, sin rellenar)
Control de isotipo (histograma gris, relleno)

		WT (FcγRI murino)		6074 HO (FcγRI humano)		Ser humano
		PBS	G-CSF 48 horas	PBS	G-CSF 48 horas	Sin tratar
Monocitos	Sangre	-/+	+	-	++	++
	Bazo	-/+	+	-	+/++	?
Macrófagos	Sangre	-/+	-/+	-		
	Bazo			-	+	?
Neutrófilos	Sangre	-	-	-		
	Bazo	-	-	-/+		?

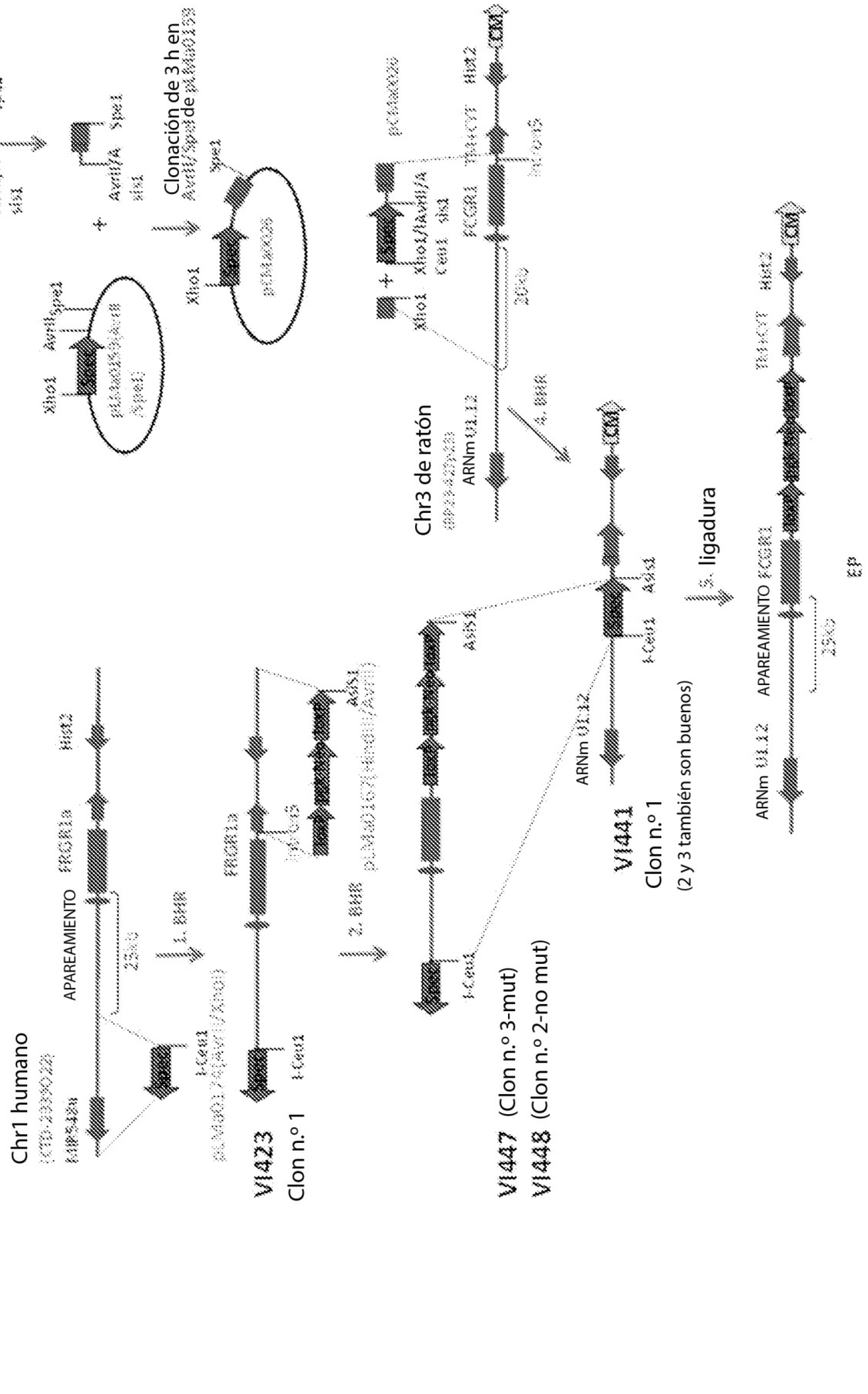
#los artículos que muestran expresión de FcγRI en sangre humana no distinguen entre monocitos y macrófagos
*los neutrófilos humanos solo expresan FcγRI tras la estimulación *in vitro* o *in vivo*



Expresión realtaiva de ARNm en bazo y sangre completos (normalizada con respecto a mHPRT1)



Valores de Ct en bazo y sangre completos


Chr1 humano
APAREAMIENTO
1. BHR
VI423
Clon n.º 1
2. BHR
VI447 (Clon n.º 3-mut)
VI448 (Clon n.º 2-no mut)
ARNm
VI441
Clon n.º 1
(2 y 3 también son buenos)
5. ligadura
ARNm
APAREAMIENTO
Chr3 de ratón
ARNm
4. BHR
Clonación de 3 h en