

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 968 749**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2015** **E 19211905 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2023** **EP 3636073**

54 Título: **Animales con C5 y C3 humanizados**

30 Prioridad:

05.05.2014 US 201461988581 P

23.10.2014 US 201462067836 P

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

13.05.2024

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

(100.0%)

777 Old Saw Mill River Road

Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

HU, YING;

LATUSZEK, ADRIANNA;

CAO, JINGTAI;

MUJICA, ALEXANDER;

WIEGAND, STANLEY;

MCWHIRTER, JOHN;

MURPHY, ANDREW;

MACDONALD, LYNN y

MEAGHER, KAROLINA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 968 749 T3

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

DESCRIPCIÓN

Animales con C5 y C3 humanizados

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad respecto de la solicitud provisional de patente de EE. UU. n.º 61/988.581, presentada el 5 de mayo de 2014 y de la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 62/067.836, presentada el 23 de octubre de 2014.

10 Campo de la invención

En el presente documento se divulgan roedores que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína C3 y/o una proteína C5 que comprende(n) una secuencia humana, así como roedores que comprenden un gen C3 y/o C5 que es humano en su totalidad o en parte. También se divulgan en el presente documento roedores que expresan proteínas C3 y/o C5 humanas o humanizadas y métodos para usar roedores que comprenden secuencias de ácidos nucleicos de C3 y/o C5 humanas o humanizadas.

20 Antecedentes

Las proteínas del complemento C5 y C3 son dianas terapéuticas para el tratamiento de una variedad de enfermedades, trastornos y afecciones humanos que se asocian con la activación del complemento, por ejemplo, enfermedades inflamatorias oculares y degenerativas de la retina. La evaluación de la farmacocinética (PK) y de la farmacodinamia (PD) de moléculas terapéuticas que se dirigen específicamente a las proteínas C5 humanas o C3 humanas se realiza de forma rutinaria en animales no humanos, por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones o ratas. Sin embargo, la PD de tales moléculas terapéuticas no se puede determinar adecuadamente en ciertos animales no humanos porque estas moléculas terapéuticas no se dirigen a las proteínas endógenas C5 o C3.

Además, la evaluación de la eficacia terapéutica de los antagonistas de las proteínas C5 o C3 específicos de humanos en diversos modelos animales no humanos de enfermedades asociadas con un sistema del complemento activado es problemática en animales no humanos, en los que tales antagonistas específicos de especies no interactúan con las proteínas C5 o C3 endógenas.

Por consiguiente, existe una necesidad de roedores, por ejemplo, animales murinos, por ejemplo, ratones o ratas, en los que los genes C5 del roedor se humanicen total o parcialmente o se reemplacen (por ejemplo, en los loci endógenos no humanos) con un gen C5 humano que comprende secuencias que codifican la proteína C5 humana o humanizada. Existe la necesidad de roedores humanizados que expresen C5 humana o humanizada en suero en concentraciones similares a las de la proteína C5 presente en el suero de un roedor de la misma edad, que expresa la proteína C5 funcional pero no comprende el gen C5 humano o humanizado, respectivamente.

Latuszek (2014) Investigative Ophthalmology & Visual science 55.13: 1324-1324 se refiere a la evaluación de la actividad del complemento en ratones de tipo silvestre, nuligénico (en inglés, knockout) para C5 y humanizados para el descubrimiento de fármacos.

45 Sumario

La presente invención proporciona un roedor, cuyo genoma comprende un reemplazo de una secuencia del gen C5 de roedor en un locus C5 endógeno de roedor con una secuencia del gen C5 humano para formar un gen C5 modificado, en donde la expresión del gen C5 modificado está bajo control de elementos reguladores de roedor en el locus C5 endógeno de roedor y da como resultado la proteína C5 humana en el suero de roedor y en donde la secuencia del gen C5 humano comprende los exones codificantes 2 a 41 de un gen C5 humano.

La invención también proporciona un ratón, cuyo genoma comprende un reemplazo de una secuencia del gen C5 de ratón que comprende codificar los exones 2 a 41 del gen C5 de ratón en un locus C5 endógeno de ratón con una secuencia del gen C5 humano que comprende codificar los exones 2 a 41 de un gen C5 humano para formar un gen C5 modificado, en donde el gen C5 modificado está unido operativamente a secuencias o elementos reguladores de ratón en el locus C5 endógeno de ratón; y

(i) un reemplazo de una secuencia del gen C3 de ratón que comprende codificar los exones 1 a 41 del gen C3 de ratón en un locus C3 endógeno de ratón con una secuencia del gen C3 humano que comprende codificar los exones 1 a 41 de un gen C3 humano para formar un gen C3 modificado o

(ii) un reemplazo de una secuencia del gen C3 de ratón que comprende codificar los exones 2 a 41 del gen C3 de ratón en un locus C3 de ratón endógeno con una secuencia del gen C3 humano que comprende codificar los exones 2 a 41 de un gen C3 humano para formar un gen C3 modificado, en donde el gen C3 modificado está unido operativamente a secuencias o elementos reguladores de ratón en el locus C3 endógeno de ratón.

La invención proporciona además un método para preparar un roedor humanizado, que comprende reemplazar una secuencia del gen C5 de roedor en un locus C5 endógeno de roedor con una secuencia del gen C5 humano que comprende codificar los exones 2 a 41 de un gen C5 humano para formar un gen C5 modificado, en donde el gen C5 modificado está operativamente unido a secuencias o elementos reguladores de roedores en el locus C5 endógeno de roedor.

La invención también proporciona un método para identificar un compuesto capaz de modular la activación del complemento que comprende:

- a. administrar el compuesto al roedor o ratón de la invención; y
- b. ensayar si la activación del complemento en el roedor o en el ratón está modulada, identificando así un compuesto capaz de modular la activación del complemento.

También se divulgan roedores que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican una C3 y/o una C5 que comprende(n) una secuencia humana.

También se divulgan roedores transgénicos que comprenden un gen C3 y/o C5 que es humano en su totalidad o en parte.

También se divulgan roedores que expresan proteínas C3 y/o C5 humanas o humanizadas.

También se divulgan roedores que tienen un reemplazo (en su totalidad o en parte) de genes C5 y/o C3 endógenos de roedores.

También se divulgan roedores que comprenden una humanización de C5 y/o de C3 (en su totalidad o en parte) en un locus C5 y/o C3 endógeno de roedor.

También se divulgan roedores que tienen genes C5 y/o C3 humanos o humanizados, en donde los roedores no expresan la proteína C5 y/o C3 endógena y expresan la proteína C5 y/o C3 humana o humanizada en suero, en concentraciones similares a las de las proteínas C5 y/o C3, respectivamente, presente(s) en el suero de un roedor de la misma edad que expresa proteínas endógenas funcionales C5 y/o C3, pero no comprende el reemplazo.

También se divulgan roedores que comprenden una secuencia de ácido nucleico C3 y/o C5 humana o humanizada.

Se divulgan roedores genéticamente modificados que comprenden un reemplazo en un locus C5 y/o C3 endógeno de un gen que codifica un gen C5 y/o C3 endógeno que codifica una proteína C5 y/o C3 humana o humanizada. Se proporcionan roedores, por ejemplo, ratones o ratas, que comprenden un reemplazo de un gen C5 endógeno, en un locus C5 endógeno de roedor, con un gen C5 humano, que también puede comprender un reemplazo de un gen C3 endógeno, en un locus C3 de roedor endógeno, con un gen C3 humano. En un caso, el roedor es un ratón. En un caso, el roedor es una rata.

También se divulgan roedores genéticamente modificados, por ejemplo, ratones o ratas, que comprenden un reemplazo en un locus C5 endógeno de roedor de un gen de roedor que codifica la proteína C5 con un gen C5 humano que codifica la proteína C5 humana o humanizada, en donde la expresión del gen C5 humano que codifica la proteína C5 humana o humanizada está bajo el control de elementos reguladores de roedor en el locus C5 endógeno de roedor. En un caso, el roedor es un ratón. En un caso, el roedor es una rata.

En una realización, el gen C5 humano que codifica la proteína C5 humana o humanizada comprende del exón 2 al exón 41 del gen C5 humano.

En una realización, el roedor es un ratón que es incapaz de expresar una proteína C5 de ratón.

En una realización, el roedor es un ratón que expresa una proteína C3 de ratón codificada por un gen C3 endógeno de ratón.

En una realización, el roedor es un ratón que también expresa una proteína C3 humana o humanizada.

En una realización, el roedor es un ratón que también comprende un reemplazo en un locus C3 endógeno de ratón de un gen de ratón que codifica la proteína C3 con un gen C3 humano que codifica una proteína C3 humana o humanizada.

En una realización, la expresión del gen C3 humano que codifica la proteína C3 humana o humanizada está bajo el control de elementos reguladores de ratón en el locus C3 endógeno de ratón.

En un aspecto, los roedores modificados genéticamente, por ejemplo, ratones o ratas, se proporcionan además comprendiendo un reemplazo en un locus C3 endógeno de roedor de un gen de roedor que codifica la proteína C3

con un gen C3 humano que codifica la proteína C3 humana o humanizada, en donde la expresión del gen C3 humano que codifica la proteína C3 humana o humanizada está bajo el control de elementos reguladores de roedor en el locus C3 endógeno de roedor. En una realización, el roedor es un ratón. En una realización, el roedor es una rata.

5 En una realización, el gen C3 humano que codifica la proteína C3 humana o humanizada comprende del exón 1 al exón 41 del gen C3 humano.

En una realización, el gen C3 humano que codifica la proteína C3 humana o humanizada comprende del exón 2 al exón 41 del gen C3 humano.

10 En una realización, el roedor es un ratón que es incapaz de expresar una proteína C3 de ratón.

En una realización, el roedor es un ratón que expresa una proteína C5 de ratón codificada por un gen C5 endógeno de ratón.

15 En una realización, el roedor es un ratón que expresa una proteína C5 humana o humanizada.

En una realización, el roedor es un ratón que comprende un reemplazo en un locus C5 endógeno de ratón de un gen de ratón que codifica la proteína C5 con un gen C5 humano que codifica una proteína C5 humana o humanizada.

20 En una realización, la expresión del gen C5 humano que codifica la proteína C5 humana o humanizada está bajo el control de elementos reguladores de ratón en el locus C5 endógeno de ratón.

25 En un aspecto, se proporcionan roedores modificados genéticamente, por ejemplo, un ratón o una rata, que expresan una proteína C5 humana o humanizada, en donde el roedor que expresa una proteína C5 humana o humanizada comprende un sistema del complemento normal, por ejemplo, los niveles de proteínas del complemento en la sangre, plasma o suero del roedor que expresa la proteína C5 humana o humanizada son similares a los niveles de proteínas del complemento en la sangre, plasma o suero de un roedor que expresa la proteína C5 endógena funcional. En una realización, el roedor es un ratón. En una realización, el roedor es una rata.

30 Los roedores genéticamente modificados proporcionados, por ejemplo, un ratón o una rata, expresan la proteína C5 de un gen C5 humano, en donde el roedor expresa proteína C5 humana o humanizada en su suero. En una realización, el roedor es un ratón. En una realización, el roedor es una rata.

35 En una realización, el suero del roedor que expresa una proteína C5 humana o humanizada tiene aproximadamente el mismo nivel de proteína C5 que un roedor que expresa una proteína C5 funcional endógena, por ejemplo, un ratón o una rata de tipo silvestre. En una realización, el roedor es un ratón. En una realización, el roedor es una rata.

40 En una realización, el ratón expresa la proteína C5 humana o humanizada en suero a una concentración de al menos aproximadamente un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 100 %, un 110 %, un 120 %, un 130 %, un 140 %, un 150 %, un 160 %, un 170 %, un 180 %, un 190 % o un 200 % del nivel de proteína C5 presente en el suero de un ratón de la misma edad que expresa la proteína C5 endógena funcional, pero no comprende un reemplazo de un gen C5 endógeno en un locus C5 endógeno de ratón con un gen C5 humano.

45 En una realización, el ratón expresa proteína C5 humana o humanizada en suero a una concentración de entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 200 %, entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 150 % o entre aproximadamente un 30 % y aproximadamente un 100 % del nivel de proteína C5 de ratón presente en el suero de un ratón de la misma edad que expresa la proteína C5 endógena funcional, pero no comprende un reemplazo de un gen C5 endógeno, en un locus C5 endógeno de ratón, con un gen C5 humano.

50 En una realización, el ratón expresa proteína C5 humana o humanizada en suero a una concentración de entre aproximadamente 10 µg/ml y aproximadamente 150 µg/ml, entre aproximadamente 10 µg/ml y aproximadamente 125 µg/ml o entre aproximadamente 15 µg/ml y aproximadamente 100 µg/ml.

55 En una realización, el ratón expresa proteína C5 humana o humanizada en suero a una concentración de al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125 o 150 µg/ml.

60 En un aspecto, se proporcionan roedores modificados genéticamente, por ejemplo, un ratón o una rata, que también expresan una proteína C3 humana o humanizada, en donde el roedor que expresa una proteína C3 humana o humanizada comprende un sistema del complemento normal, es decir, los niveles de proteínas del complemento en la sangre, plasma o suero del roedor que expresa la proteína C3 humana o humanizada son similares a los niveles de proteínas del complemento en la sangre, plasma o suero de un roedor que expresa la proteína C3 endógena funcional. En una realización, el roedor es un ratón. En una realización, el roedor es una rata.

65 En un aspecto, se proporcionan roedores modificados genéticamente, por ejemplo, un ratón o una rata, que también expresan proteína C3 de un gen C3 humano, en donde el roedor expresa proteína C3 humana o humanizada en su

suero. En una realización, el roedor es un ratón. En una realización, el roedor es una rata.

5 En una realización, el suero del roedor que también expresa una proteína C3 humana o humanizada tiene aproximadamente el mismo nivel de proteína C3 que un roedor que expresa una proteína C3 funcional endógena, por ejemplo, un ratón o una rata de tipo silvestre. En una realización, el roedor es un ratón. En una realización, el roedor es una rata.

10 En una realización, el ratón también expresa la proteína C3 humana o humanizada (hC3) en suero a una concentración de al menos aproximadamente un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 100 %, un 110 %, un 120 %, un 130 %, un 140 %, un 150 %, un 160 %, un 170 %, un 180 %, un 190 % o un 200 % del nivel de proteína C3 presente en el suero de un ratón de la misma edad que expresa la proteína C3 endógena funcional, pero no comprende un reemplazo de un gen C3 endógeno, en un locus C3 endógeno de ratón, con un gen C3 humano.

15 En una realización, el ratón también expresa la proteína C3 humana en suero a una concentración de entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 200 %, entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 150 % o entre aproximadamente un 30 % y aproximadamente un 100 % del nivel de proteína C3 de ratón presente en el suero de un ratón de la misma edad que expresa la proteína C3 endógena funcional, pero no comprende un reemplazo de un gen C3 endógeno, en un locus C3 endógeno de ratón, con un gen C3 humano.

20 En una realización, el ratón también expresa proteína C3 humana o humanizada en suero a una concentración de entre aproximadamente 100 µg/ml y aproximadamente 1500 µg/ml, entre aproximadamente 200 µg/ml y aproximadamente 1250 µg/ml o entre aproximadamente 300 µg/ml y aproximadamente 1000 µg/ml.

25 En una realización, el ratón también expresa proteína C3 humana o humanizada en suero a una concentración de al menos aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1250 o 1500 µg/ml.

30 En un aspecto, se proporciona un roedor genéticamente modificado, que comprende un gen C5 humano que comprende un reemplazo en un locus C5 endógeno de roedor de un gen de roedor que codifica la proteína C5 con un gen C5 humano que codifica la proteína C5 humana o humanizada, en donde la expresión del gen C5 humano que codifica la proteína C5 humana o humanizada está bajo el control de secuencias o elementos reguladores de roedor en el locus C5 endógeno de roedor, dando como resultado la proteína C5 humana en el suero de roedor y en donde la secuencia del gen C5 humano comprende los exones codificantes 2 a 41 de un gen C5 humano, en donde el roedor comprende además un gen C3 humano que comprende un reemplazo en un locus C3 endógeno de roedor de un gen de roedor que codifica la proteína C3 con un gen C3 humano que codifica la proteína C3 humana o humanizada, en donde la expresión del gen C3 humano que codifica la proteína C3 humana o humanizada está bajo control de secuencias o elementos reguladores de roedor en el locus C3 endógeno de roedor. En una realización, el roedor es un ratón. En una realización, el roedor es una rata.

40 En una realización, el ratón es incapaz de expresar una proteína C5 de ratón e incapaz de expresar una proteína C3 de ratón.

45 En una realización, las secuencias o elementos reguladores de roedores en el locus C3 endógeno de roedores son de un ratón o de una rata.

En una realización, las secuencias o elementos reguladores de roedores son las secuencias o elementos reguladores de roedores endógenos en el locus C3 de roedor que provienen de un ratón o una rata.

50 En un aspecto, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata, de la presente invención también puede expresar la proteína C3 de un locus C3 endógeno no humano. En una realización, el roedor es un ratón. En una realización, el roedor es una rata.

55 También se divulga un ratón genéticamente modificado que expresa la proteína C5 humana o humanizada a partir de un locus C5 endógeno de ratón, en donde el gen C5 endógeno de ratón se ha reemplazado, en su totalidad o en parte, con un gen C5 humano.

60 En una realización, aproximadamente 75,8 kb en el locus C5 endógeno del ratón, incluyendo los exones 2 a 42 y una secuencia 3' no traducida, se eliminan y se reemplazan con aproximadamente 97 kb de la secuencia del gen C5 humano que comprende los exones 2 a 41 del gen C5 humano. En una realización específica, el gen C5 humano comprende los exones 2 a 42 del gen C5 humano de BAC CTD-2559119 humano. En una realización específica, el gen C5 comprende el exón 1 de C5 de ratón y los exones 2 a 42 de C5 humano.

65 También se divulga un ratón genéticamente modificado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína C5 humana o humanizada, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína C5 humana o humanizada reemplaza, en su totalidad o en parte, una secuencia de nucleótidos endógena que codifica una proteína C5 endógena de ratón.

En un aspecto, el ratón modificado genéticamente proporcionado puede expresar además la proteína C3 humana o humanizada a partir de un locus C3 de ratón endógeno, en donde el gen C3 endógeno de ratón se ha reemplazado, en su totalidad o en parte, con un gen C3 humano.

5 En una realización, una porción del locus C3 endógeno de ratón, que incluye elementos reguladores 5' aguas arriba del exón 1 al exón 41, se elimina y se reemplaza con una secuencia del gen C3 humano que comprende elementos reguladores 5' aguas arriba del exón 1 al exón 41 del gen C3 humano. En una realización específica, el gen C3 humano comprende toda la región codificante de C3 humano.

10 En una realización, una porción del locus C3 endógeno de ratón, que incluye una porción del intrón 1 y los exones 2 a 41, se elimina y se reemplaza con una secuencia del gen C3 humano que comprende una porción del intrón 1 y los exones 2 al exón 41 del gen C3 humano. En una realización específica, el gen C3 comprende el exón 1 de C3 de ratón y los exones 2 a 41 de C3 humano.

15 En un aspecto, se proporciona un método para preparar un roedor con C5 humanizado, que comprende reemplazar una secuencia del gen C5 de roedor en un locus C5 endógeno de roedor con una secuencia del gen C5 humano que comprende codificar los exones 2 a 41 de un gen C5 humano para formar un gen C5 modificado, en donde el gen C5 modificado está operativamente unido a secuencias o elementos reguladores de roedores en el locus C5 endógeno de roedor. En una realización, el roedor es un ratón. En una realización, el roedor es una rata.

En una realización, las secuencias o elementos reguladores de roedores se derivan de un ratón. En una realización, las secuencias o elementos reguladores de roedores se derivan de una rata.

25 En una realización, los elementos o secuencias reguladores de roedores son elementos o secuencias reguladores de roedores endógenos en el locus C5 de roedor. En una realización, el roedor es un ratón. En una realización, el roedor es una rata.

30 En una realización, la secuencia del gen C5 humano que reemplaza la secuencia del gen C5 de roedor comprende al menos 40 exones de la secuencia del gen C5 humano. En una realización, la secuencia del gen C5 humano que reemplaza la secuencia del gen C5 de roedor comprende los 41 exones de la secuencia del gen C5 humano. En una realización, el roedor es un ratón. En una realización, el roedor es una rata.

35 En una realización, el reemplazo es en un locus C5 endógeno de roedor y la secuencia del gen C5 humano comprende los exones codificantes 2 a 41 de un gen C5 humano unidos operativamente a secuencias o elementos reguladores de roedor en el locus C5 endógeno de roedor.

También se divulga un método para preparar un ratón con C5 humanizado, que comprende reemplazar una secuencia del gen C5 de ratón que codifica la proteína C5 de ratón con una secuencia del gen C5 humano que codifica la proteína C5 humana o humanizada.

40 En una realización, el reemplazo es en un locus C5 endógeno de ratón y el gen C5 humano que codifica la proteína C5 humana o humanizada está unido operativamente a secuencias o elementos reguladores de ratón en el locus C5 endógeno de ratón.

45 En una realización, el reemplazo es en un locus C5 endógeno de ratón y el gen C5 humano que codifica la proteína C5 humana o humanizada está unido operativamente a secuencias o elementos reguladores endógenos de ratón en el locus C5 endógeno de ratón.

50 También se describe un método para preparar un roedor C3 humanizado, que comprende reemplazar una secuencia del gen C3 de roedor que codifica la proteína C3 de roedor con una secuencia del gen C3 humano que comprende uno o más exones de la secuencia del gen C3 humano que codifica la proteína C3 humana o humanizada. En un caso, el roedor es un ratón. En un caso, el roedor es una rata.

55 En una realización, el roedor puede comprender además un reemplazo en un locus C3 endógeno de roedor con una secuencia del gen C3 humano que comprende uno o más exones de la secuencia del gen C3 humano que codifica la proteína C3 humana o humanizada unida operativamente a secuencias o elementos reguladores de roedor en el locus C3 endógeno de roedor. En una realización, el roedor es un ratón. En una realización, el roedor es una rata.

60 En una realización, las secuencias o elementos reguladores de roedores se derivan de un ratón. En una realización, las secuencias o elementos reguladores de roedores se derivan de una rata.

65 En una realización, los elementos o secuencias reguladores de roedores son elementos o secuencias reguladores de roedores endógenos en el locus C3 de roedor. En una realización, el roedor es un ratón. En una realización, el roedor es una rata.

En una realización, la secuencia del gen C3 humano que reemplaza la secuencia del gen C3 de roedor comprende al menos un exón de la secuencia del gen C3 humano. En otras realizaciones, la secuencia del gen C3 humano que reemplaza la secuencia del gen C3 de roedor comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 exones de la secuencia del gen C3 humano. En una realización, la secuencia del gen C3 humano que reemplaza la secuencia del gen C5 de roedor comprende los 41 exones de la secuencia del gen C3 humano. En una realización, el roedor es un ratón. En una realización, el roedor es una rata.

En una realización, el reemplazo es en un locus C3 endógeno de roedor y la secuencia del gen C3 humano que comprende uno o más exones de la secuencia del gen C3 humano que codifica la proteína C3 humana o humanizada está unida operativamente a secuencias o elementos reguladores endógenos de roedor en el locus C3 endógeno de roedor.

También se divulga un método para preparar un ratón con C3 humanizado, que comprende reemplazar una secuencia del gen C3 de ratón que codifica la proteína C3 de ratón con una secuencia del gen C3 humano que codifica la proteína C3 humana o humanizada.

En un caso, el reemplazo es en un locus C3 endógeno de ratón y el gen C3 humano que codifica la proteína C3 humana o humanizada está unido operativamente a secuencias o elementos reguladores endógenos de ratón en el locus C3 endógeno de ratón.

En un caso, el reemplazo es en un locus C3 endógeno de ratón y el gen C3 humano que codifica la proteína C3 humana o humanizada está unido operativamente a secuencias o elementos reguladores de ratón en el locus C3 endógeno de ratón.

En diversos aspectos, los roedores modificados genéticamente, por ejemplo, ratones o ratas, descritos en el presente documento comprenden las modificaciones genéticas en su línea germinal.

En un aspecto, se proporciona un embrión de roedor, por ejemplo, un ratón o una rata, que comprende una modificación genética como se describe en el presente documento.

En un aspecto, se proporciona un embrión hospedador de roedor, por ejemplo, de un ratón o de una rata, que comprende una célula donante que comprende una modificación genética como se describe en el presente documento.

En un aspecto, se proporciona una célula pluripotente o totipotente de roedor, por ejemplo, de ratón o de rata, que comprende una modificación genética como se describe en el presente documento. En una realización, la célula es una célula de ratón. En una realización, la célula es una célula ES de roedor. En una realización, la célula es una célula ES de ratón.

En un aspecto, se proporciona un óvulo de roedor, por ejemplo, de ratón o de rata, en donde el óvulo de roedor comprende un cromosoma de roedor ectópico, en donde el cromosoma de roedor ectópico comprende una modificación genética como se describe en el presente documento. En una realización, el roedor es un ratón. En una realización, el roedor es una rata.

En un aspecto, el embrión, óvulo o célula de ratón que está modificado genéticamente para comprender un gen C5 humano, que también puede modificarse para comprender un gen C3 humano, es de un ratón que es de una cepa C57BL seleccionada de C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr y C57BL/Ola. En otra realización, el ratón es una cepa 129 seleccionada del grupo que consiste en una cepa que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (véase, por ejemplo, Resting *et al.* (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836, véase también, Auerbach *et al.* (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv-and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines). En una realización específica, el ratón genéticamente modificado es una mezcla de una cepa 129 anteriormente mencionada y de una cepa C57BU6 anteriormente mencionada. En otra realización específica, el ratón es una mezcla de las cepas 129 anteriormente mencionadas o una mezcla de las cepas BU6 anteriormente mencionadas. En una realización específica, la cepa 129 de la mezcla es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En otra realización, el ratón es una cepa BALB, por ejemplo, una cepa BALB/c. En otra realización adicional, el ratón es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa anteriormente mencionada. En una realización, el ratón es un ratón Swiss o Swiss Webster.

La presente invención proporciona además un método para identificar un compuesto capaz de modular la activación del complemento que comprende:

- a. administrar el compuesto a un roedor o ratón de la presente invención; y
- b. ensayar si la activación del complemento en el roedor o en el ratón está modulada, identificando así un

compuesto capaz de modular la activación del complemento. En una realización, el compuesto es un compuesto químico de molécula pequeña, un anticuerpo, una proteína, un ácido nucleico inhibidor o cualquier combinación de los mismos. En otra realización de cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, el compuesto modula la activación del complemento aumentando la actividad del complemento. En otra realización de cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, el compuesto modula la activación del complemento disminuyendo la actividad del complemento. En otra realización de cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, se analiza el suero del roedor para determinar si la activación del complemento en el roedor está modulada. En una realización adicional, el ensayo es un ensayo CH₅₀ de detección del complemento.

Cada uno de los aspectos y realizaciones descritos en el presente documento se pueden utilizar juntos, a menos que se excluya explícita o claramente del contexto de la realización o aspecto.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona una ilustración, no a escala, de los loci genómicos C5 de ratón (arriba) y humano (abajo). Se indican las regiones de los genes C5 de ratón y humanos que se eliminan y reemplazan, respectivamente, para generar ratones con C5 humanizados.

La Figura 2 proporciona una ilustración, no a escala, de los loci genómicos C3 de ratón (mC3) y humanizados (hC3). (A) El gen C3 de ratón, que abarca los elementos reguladores 5' y la región codificante del exón 1 al exón 41, se elimina y se reemplaza por los elementos reguladores 5' y la región codificante del exón 1 al exón 41 del gen C3 humano y un sitio loxP, como se indica mediante una línea en negrita y una flecha, respectivamente. (B) El gen C3 de ratón, que abarca una porción del intrón 1 y la región codificante del exón 2 al exón 41, se elimina y se reemplaza por una porción del intrón 1 y la región codificante del exón 2 al exón 41 del gen C5 humano y un sitio loxP, como se indica mediante una línea en negrita y una flecha, respectivamente.

La Figura 3 muestra que el complemento de ratón tiene menor actividad en un ensayo hemolítico que el complemento humano.

La Figura 4 muestra que la actividad hemolítica del complemento se bloquea por anticuerpos monoclonales anti-C5 específicos de especie de una manera específica de especie.

La Figura 5 muestra que los ratones con C5 humanizados son nuligénicos funcionales para C5 de ratón. (A) La adición de proteína C5 o C3 humana reconstituye la actividad hemolítica en suero humano empobrecido en C5 o C3, respectivamente. (B) La proteína C5 de ratón, pero no humana, reconstituye la actividad hemolítica en sueros C5^{-/-} y C5 humanizados de ratón. (C) Los niveles de proteína C5 humana en el suero de ratón con C5 humanizado son tres veces más bajos que en el suero humano. (D) Los niveles del complemento C5 previos a la dosis en ratones con C5 humanizados varían entre machos y hembras. En el suero de ratón con C5 humanizado está presente un intervalo de C5 humana de 20 a 100 µg/ml.

La Figura 6 muestra que la adición de proteínas C3 y C5 humanas, pero no de la proteína C5 humana sola, reconstituye la actividad hemolítica en C5^{-/-} suero de ratón.

La Figura 7 muestra que el suero de ratón con C5 humanizado requiere la adición de proteína C3 humana para alcanzar niveles de tipo silvestre de la actividad hemolítica de ratón.

La Figura 8 muestra los resultados de un ensayo de hemólisis realizado en muestras de suero de ratones con C5 humanizados expuestos al anticuerpo anti-C5 humana (C5Ab) usando 400 µg/ml de proteína C3 humana (A) y 800 µg/ml de proteína C3 humana (B).

La Figura 9 muestra los resultados de un ensayo farmacocinético que mide los niveles de anticuerpos anti-C5 humana en función del tiempo tras la inyección para todos los animales en el estudio (A) y para los animales hembra (arriba) y macho (abajo) (B).

La Figura 10A muestra que añadir proteína C3 humana al suero de ratón de tipo silvestre puede mejorar la función hemolítica, pero no en la misma medida en que se observa en el suero humano normal (para cada punto de datos de los ratones, se mezcló suero de 3 animales). La Figura 10B muestra que la función hemolítica se puede restaurar en ratones C5^{hu/hu} humanizados cuando se suplementaron con proteína C3 humana.

La Figura 11 muestra que añadir proteína C3 humana al suero derivado de ratones nuligénicos para C3 puede rescatar la función hemolítica (para cada punto de datos de los ratones, se mezcló suero de 3 animales).

La Figura 12 muestra que añadir proteína C3 humana solo al suero de ratones nuligénicos para C5 no puede rescatar la función hemolítica (para cada punto de datos de los ratones, se mezcló suero de 3 animales).

Descripción detallada

El sistema del complemento es un componente esencial del sistema inmunitario innato y desempeña un papel fundamental como mecanismo de defensa contra patógenos invasores, cebs las respuestas inmunitarias adaptativas y ayuda a eliminar complejos inmunitarios y células apoptóticas. Si bien el sistema del complemento desempeña un papel fundamental en muchas funciones inmunitarias protectoras, la activación del complemento es un mediador considerable del daño tisular en una amplia gama de procesos patológicos autoinmunes e inflamatorios.

La invención descrita en el presente documento proporciona, entre otros, roedores que expresan proteína C5 humana o humanizada en suero en concentraciones similares a la expresión de tipo silvestre de C5 endógeno en roedores. Los animales también pueden expresar proteína C3 humana o humanizada en suero en concentraciones similares a la expresión de tipo silvestre de C3 endógeno en roedores. También se describen animales que expresan proteína C3 humana o humanizada en suero en concentraciones similares a la expresión de tipo silvestre de C3 endógeno en roedores. La ingeniería genética exitosa de roedores capaces de expresar proteínas C5 y/o C3 humanas o humanizadas proporciona una herramienta necesaria y útil para recapitular el sistema del complemento humano en animales de laboratorio susceptibles de ensayos de detección de fármacos a gran escala y de alto rendimiento. También se proporcionan en el presente documento métodos para usar los roedores descritos en el presente documento para identificar compuestos capaces de modular la activación del complemento. Los métodos se basan, en parte, en el descubrimiento de los presentes inventores de que, si bien la actividad del complemento de la proteína C5 es específica de cada especie (es decir, la proteína C5 humana no puede sustituir a la proteína C5 de ratón), la actividad del complemento de la proteína C3 humana es capaz de sustituir a la proteína C3 de ratón en la actividad del complemento sérico de ratón.

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos e inmunología, que son bien conocidas por los expertos en la materia. Dichas técnicas se explican con detalle en las referencias, tales como, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, cuarta edición (Sambrook *et al.*, 2012) y *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición (Sambrook y Russel, 2001), (conjuntamente denominado en este documento "Sambrook"); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987, incluyendo los suplementos hasta 2014); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, eds., 1994); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (Greenfield, ed., 2014), Beaucage *et al.* eds., "Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry", John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2000, (incluidos suplementos hasta 2014) y *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells* (Makrides, ed., Elsevier Sciences B.V., Ámsterdam, 2003).

Definiciones

Como se utiliza en el presente documento, el término "proteína" incluye polipéptidos, péptidos, fragmentos de polipéptidos y polipéptidos de fusión.

Como se utiliza en el presente documento, un "ácido nucleico" se refiere a dos o más desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos unidos covalentemente en forma simple o bicatenaria.

Por "unido operativamente" se entiende un enlace funcional entre una secuencia de control de la expresión de ácido nucleico (tal como un promotor) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

El término "reemplazo", en referencia al reemplazo de genes, se refiere a situar material genético exógeno en un locus genético endógeno, reemplazando así la totalidad o una porción del gen endógeno por una secuencia del ácido nucleico ortóloga u homóloga. En un caso, un gen o fragmento del mismo endógeno de roedor se reemplaza con un gen o fragmento del mismo humano correspondiente. Un gen o fragmento del mismo humano correspondiente es un gen o fragmento humano que es un ortólogo de, un homólogo de, o es sustancialmente idéntico o el mismo en estructura y/o función, que el gen o fragmento del mismo endógeno de roedor que se reemplaza. Tal como se demuestra en los Ejemplos siguientes, las secuencias de nucleótidos de los loci de los genes C3 y/o C5 de roedores endógenos (por ejemplo, ratón) se reemplazaron por secuencias de nucleótidos correspondientes a los loci de los genes C3 y/o C5 humanos. También se divulga que puede ocurrir un reemplazo génico cuando un gen endógeno se elimina o se vuelve no funcional (tal como mediante la inserción de una mutación sin sentido o un codón de terminación prematuro) y se inserta un gen o fragmento del mismo humano correspondiente en la línea germinal en una localización separada.

El término "humanizado" tal como se utiliza en las expresiones "alelo C3 humanizado" o "alelo C5 humanizado", o "gen C3 humanizado", o "gen C5 humanizado" incluye, pero no se limita a, realizaciones en donde todo o una parte de un gen o alelo C3 y/o C5 endógeno no humano se reemplaza por una porción correspondiente del gen o alelo C3 y/o C5 humano. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el término "humanizado" se refiere a la sustitución completa

de la región codificante (por ejemplo, los exones) del gen o alelo C3 y/o C5 endógeno no humano con la región codificante correspondiente del gen o alelo C3 y/o C5 humano, al tiempo que las regiones endógenas no codificantes (tales como, aunque no de forma limitativa, el promotor, la(s) región(es) no traducida(s) 5' y/o 3', elementos potenciadores, etc.) del roedor no se reemplazan. En algunas realizaciones, el roedor, es una rata o un ratón.

Una "proteína humanizada" incluye, pero no se limita a, realizaciones en donde toda o una porción de la proteína C3 y/o C5 no endógena humana se reemplaza por la porción correspondiente de la proteína C3 y/o C5 humana. En algunas realizaciones, una "proteína humanizada" puede codificarse mediante un gen o alelo C3 y/o C5 humanizado pero aun así codificar una proteína C3 y/o C5 completamente humana (tal como, aunque no de forma limitativa, la situación en donde todas las regiones codificantes (por ejemplo, los exones) del gen o alelo C3 y/o C5 endógeno no humano se reemplazan por las regiones codificantes correspondientes del gen o alelo C3 y/o C5 humano pero la(a) región(ones) no codificante(s) (tales como, aunque no de forma limitativa, el promotor, la(s) región(es) no traducida(s) 5' y/o 3', elementos potenciadores, etc.) del roedor no se reemplaza(n)). En algunas realizaciones, el roedor es una rata o un ratón. En un roedor de la invención, la secuencia del gen C5 humano comprende los exones codificantes 2 a 41 de un gen C5 humano.

"Modula", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la capacidad de un compuesto para alterar la actividad del sistema del complemento. En una realización, la modulación del sistema del complemento por un compuesto se refiere a la disminución de la activación del complemento en un sujeto (un roedor, tal como un ratón). En otra realización, la modulación del sistema del complemento por un compuesto se refiere al aumento de la actividad mediada por el complemento en un sujeto.

Como se utiliza en el presente documento, el término "roedor" se refiere a cualquier miembro del orden Rodentia. Entre los ejemplos de roedores se incluyen, sin limitación, ratones, ratas, ardillas, perros de la pradera, puercoespines, castores, cobayas y hámsteres. En una realización, un roedor es una rata. En otra realización, un roedor es un ratón.

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un personal experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención.

Como se utiliza en el presente documento, los términos en singular "un", "una", y "el" o "la", incluyen la referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Se entiende que toda limitación numérica máxima indicada en esta memoria descriptiva incluye toda limitación numérica inferior, como si dichas limitaciones numéricas inferiores se escribieran expresamente en el presente documento. Cada limitación numérica mínima dada a lo largo de esta especificación incluirá cada limitación numérica más alta, como si dichas limitaciones numéricas más altas se escribieran expresamente en el presente documento. Cada intervalo numérico dado a lo largo de la presente memoria descriptiva incluirá cada intervalo numérico más estrecho que se encuentre dentro de tal intervalo numérico más amplio, tal como si tales intervalos numéricos más estrechos estuvieran expresamente escritos en el presente documento.

Sistema del complemento

El complemento, un componente esencial del sistema inmunitario, consiste en más de 30 proteínas séricas y celulares que participan en dos cascadas bioquímicas vinculadas, las rutas clásica y alternativa. El complemento funciona para ayudar al sistema inmunitario a destruir microorganismos invasores y mantener la homeostasis de los tejidos.

Sin embargo, la activación excesiva o no regulada del complemento contribuye al daño tisular y está asociada con una variedad de enfermedades, trastornos y afecciones humanas que se asocian con la activación del complemento, por ejemplo, enfermedades inflamatorias oculares y degenerativas de la retina (véanse Makrides (1998) *Therapeutic inhibition of the complement system*, *Pharmacological Reviews* 50(1):59-87; y Molnes *et al.* (2006) *Strategies of therapeutic complement inhibition*, *Molecular Immunology* 43:107-121). Otras enfermedades o afecciones que se sabe que están asociadas con la activación aberrante del complemento incluyen, sin limitación, asma alérgica y la inflamación de las vías respiratorias y la hiperreactividad de las vías respiratorias ("AHR", por sus siglas en inglés), enfermedad pulmonar obstructiva crónica ("EPOC"), aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonía por hipersensibilidad, neumonía eosinófila, enfisema, bronquitis, bronquitis alérgica, bronquiectasia, fibrosis quística, tuberculosis, neumonitis por hipersensibilidad, asma laboral, sarcoidosis, síndrome de enfermedad reactiva de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar intersticial, síndrome hipereosinófilo, rinitis, sinusitis, asma inducida por el ejercicio, asma inducida por la contaminación, asma variante por tos, enfermedad pulmonar parasitaria, infecciones por virus sincitial respiratorio ("VSR"), infección por el virus parainfluenza ("PIV", por sus siglas en inglés), infección por rinovirus ("RV") e infección por adenovirus y lesión por isquemia-reperfusión (véanse, por ejemplo, la publicación de Solicitud de patente de EE. UU. n.º 2005/0260198).

Gen y proteína del complemento C5

El gen C5 codifica la proteína del complemento C5 sérica, que juega un papel importante en los procesos inflamatorios

y de destrucción celular. La proteína C5 madura está compuesta por cadenas α y β unidas por un enlace disulfuro. La proteína C5 se escinde mediante una convertasa, dando como resultado un péptido de activación, C5a, una anafilatoxina derivada del polipéptido α , que es en gran medida proinflamatorio y C5b, un producto de escisión macromolecular derivado del polipéptido β , que forma un complejo con otros componentes del complemento para formar un complejo de ataque a la membrana (MAC, por sus siglas en inglés), que participa en la lisis osmótica de las células diana.

C5 humano. Símbolo oficial: **C5**; ID gen de NCBI: 727; Fuente principal: HGNC:1331; ID de ARNm de RefSeq: NM_001735.2; ID de UniProt: P01031; Ensamblaje genómico: GRCh38; Localización: chr9:120,952,335-121,050,275 - cadena.

El gen C5 humano se encuentra en el cromosoma 9, en 9q33-q34. El gen C5 humano tiene 41 exones y codifica un polipéptido precursor de 1676 aminoácidos de longitud, incluyendo un péptido señal de 18 aminoácidos, una cadena β de 655 aminoácidos y una cadena α de 999 aminoácidos. Durante la activación del complemento se escinde la cadena α , generando así un C5a de 74 aminoácidos, que es una potente anafilatoxina proinflamatoria.

La deficiencia de C5 en seres humanos se asocia con una mayor susceptibilidad a infecciones recurrentes graves.

El gen C5 se conserva entre varias especies, incluyendo primates, por ejemplo, chimpancé, mono Rhesus, otros mamíferos, por ejemplo, perro, vaca, roedor, por ejemplo, ratón, pollo, pez cebra y rana.

C5 de ratón. Símbolo oficial: **Hc**; ID gen de NCBI: 15139; Fuente principal: MGI:96031; ID de ARNm de RefSeq: NM_010406.2; ID de UniProt: P06684; Ensamblaje genómico: GRCm38; Localización: chr2:34,983,331-35,061,449 - cadena.

El gen C5 del ratón se encuentra en el cromosoma 2, a 2 23,22 cM. El gen C5 de ratón tiene 42 exones y codifica un polipéptido precursor de 1680 aminoácidos de longitud, incluyendo un péptido señal de 18 aminoácidos, una cadena β de 656 aminoácidos y una cadena α de 1002 aminoácidos. Durante la activación del complemento se escinde la cadena α , generando así un C5a de 77 aminoácidos, que es una potente anafilatoxina proinflamatoria.

La deficiencia de C5 se observa en varias cepas comunes de ratones de laboratorio que tienen una delección común de 2 pares de bases cerca del extremo 5' del ADNc que da como resultado la incapacidad de secretar C5; por tanto, estos ratones son funcionalmente deficientes en C5, es decir, nuligénicos para C5 (6 de tales cepas son A/HeJ, AKR/J, DBA/2J, NZB/B1NJ, SWR/J y B10.D2/oSnJ) (véase, por ejemplo, Wetzel *et al.* (1990) Deficiency of the murine fifth complement component (C5): a 2-base pair deletion in a 5' exon, J Biol Chem 265: 2435-2440). También pueden generarse ratones nuligénicos para C5 siguiendo procedimientos estándar conocidos en la técnica.

Gen y proteína del complemento C3

El gen C3 codifica la proteína del complemento C3 sérica, que juega un papel central en la activación de las rutas de activación del complemento clásica y alternativa.

El gen C3 humano se localiza en el cromosoma 19 en 19p13.3-p13.2. El gen C3 humano tiene 41 exones y codifica un polipéptido precursor de 1663 aminoácidos, incluyendo un péptido señal de 22 aminoácidos, una cadena β de 645 aminoácidos y una cadena α de 992 aminoácidos. Durante la activación del complemento se escinde la cadena α , por tanto, generando 9 péptidos diferentes, incluyendo un C3a de 77 aminoácidos, que es una potente anafilatoxina proinflamatoria.

La deficiencia de C3 en seres humanos se asocia con una mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas.

El gen C3 se conserva entre varias especies, incluyendo primates, por ejemplo, chimpancé, mono Rhesus, otros mamíferos, por ejemplo, perro, vaca, roedor, por ejemplo, ratón, pollo, pez cebra y rana.

El gen C3 de ratón se encuentra en el cromosoma 17 en 17 29,72 cM. El gen C3 de ratón tiene 41 exones y codifica un polipéptido precursor de 1663 aminoácidos, incluyendo un péptido señal de 24 aminoácidos, una cadena β de 642 aminoácidos y una cadena α de 993 aminoácidos. Durante la activación del complemento se escinde la cadena α , por tanto, generando 9 péptidos diferentes, incluyendo un C3a de 78 aminoácidos, que es una potente anafilatoxina proinflamatoria.

Se han generado ratones nuligénicos para C3 siguiendo procedimientos estándar conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Drouin *et al.* (2001) Cutting edge: the absence of 3 demonstrates a role for complement in Th2 effector functions in a murine model of pulmonary allergy, J Immunology 167:4141-4144).

Especificidad de especie de las proteínas del complemento C5 y C3

En el presente documento se muestra que los ratones con C5 humanizados son funcionalmente deficientes en C5

porque al menos algunas de las proteínas endógenas del complemento muestran especificidad de especie, es decir, las proteínas del complemento endógenas de ratón no pueden interactuar funcionalmente con la proteína C5 humana. Se analizó la actividad del complemento en suero obtenido de ratones con C5 humanizados o de ratones nuligénicos para C5; no se observó actividad hemolítica del complemento a menos que se añadieran proteínas C3 y C5 humanas.

5 También se muestra en el presente documento que la adición de C3 humana a sueros obtenidos de ratones nuligénicos para C3 pudo rescatar la función hemolítica; se observó actividad del complemento en ratones nuligénicos para C3 cuando se añadió proteína C3 humana al suero.

10 La actividad del complemento de la proteína C5 es específica de especie, es decir, la proteína C5 humana no puede sustituir a la proteína C5 de ratón en un ensayo de actividad (es decir, hemólisis) del complemento sérico de ratón.

La actividad complementaria de la proteína C3, por el contrario, no parece ser igualmente específica de especie, es decir, la proteína C3 humana puede sustituir a la proteína C3 de ratón en un ensayo de actividad (es decir, hemólisis) del complemento sérico de ratón.

Inhibición terapéutica del sistema del complemento

20 Los péptidos de activación del complemento C5a y C3a son dos dianas para la inhibición terapéutica del complemento que se generan tras la activación del complemento mediante escisión enzimática, tanto en la ruta clásica como en la alternativa, a partir de las proteínas del complemento C5 y C3, respectivamente (véase Markides (1998); Mollnes *et al.* (2006)).

25 Por ejemplo, el bloqueo de la escisión de C5 por anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos divulgados en la patente de EE.UU. n.º 6.355.245, es una posible estrategia terapéutica para la inhibición del complemento en enfermedades asociadas con la activación del complemento.

Especificidad de especie de los inhibidores de C5 y C3 humanos

30 Las moléculas terapéuticas candidatas que se dirigen a las proteínas del complemento C5 o C3 generalmente se evalúan para determinar su farmacocinética (PK) y su farmacodinamia (PK) en roedores, por ejemplo, ratones o ratas. Tales moléculas terapéuticas también se prueban para detectar la eficacia terapéutica *in vivo* en roedores, por ejemplo, ratón o rata, modelos de enfermedades, trastornos y afecciones humanas asociados con la activación del complemento.

35 Sin embargo, las moléculas terapéuticas, que son específicas de las proteínas del complemento humano C5 o C3, es decir, inhibidores de C5 o C3 específicos para humanos, no puede evaluarse adecuadamente para detectar PD o la eficacia terapéutica *in vivo* en roedores, en particular, ratones, porque faltan las dianas de estas moléculas terapéuticas. Este problema no se soluciona utilizando roedores transgénicos, por ejemplo, ratones o ratas, que expresan proteínas del complemento C5 o C3 humanas, debido a la especificidad de especie de estas proteínas mencionada anteriormente.

40 Por consiguiente, para evaluar la PD y la eficacia terapéutica *in vivo* de un antagonista o inhibidor de la proteína C5 o C3 específico para humanos en roedores, por ejemplo, ratones o ratas, es deseable reemplazar las proteínas C5 y/o C3 endógenas con proteínas C5 y/o C3 humanas. Además, para evitar posibles problemas de sobreexpresión o subexpresión de las proteínas C5 y/o C3 humanas, es deseable insertar los genes humanos C5 y/o C3 en el genoma de los roedores, por ejemplo, ratones o ratas, en los loci endógenos de los genes C5 y/o C3 y para expresar las proteínas C5 y/o C3 humanas en roedores, por ejemplo, ratones o ratas, bajo el control, al menos en parte, de los elementos reguladores endógenos de C5 y/o C3.

Creación de roedores con C3 y/o C5 humanizados

Los métodos para generar los roedores con C3 y/o C5 humanizados descritos en el presente documento son bien conocidos en la técnica (véase, en general, Gene Targeting: A Practical Approach, Joyner, ed., Oxford University Press, Inc. (2000)). En una realización, la generación de los ratones puede implicar opcionalmente la alteración de los genes C3 y/o C5 murinos y la introducción del gen que codifica C3 y/o C5 humana o humanizada en el genoma murino. La introducción del gen que codifica la C5 humana o humanizada se realiza en el mismo lugar que los genes C5 murinos endógenos. En una realización, la introducción de un gen que codifica el gen C3 humano o humanizado está en la misma localización que el gen C3 murino endógeno.

60 Los roedores transgénicos de la invención pueden producirse introduciendo transgenes en la línea germinal del animal. Se pueden utilizar células diana embrionarias en diversas etapas de desarrollo para introducir transgenes. Se utilizan diferentes métodos dependiendo de la etapa de desarrollo de la célula embrionaria diana. La(s) línea(s) específica(s) de cualquier animal utilizado para practicar esta invención se seleccionan por su buena salud general, buenos rendimientos de embriones, buena visibilidad pronuclear en el embrión y buena capacidad reproductiva. Cuando se van a producir ratones transgénicos, a menudo se utilizan cepas tales como C57BL/6 o C57BL/6 x DBA/2 F₁ o líneas

FVB (obtenidas comercialmente de Charles River Labs, Boston, Massachusetts, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine o Taconic Labs.).

La introducción del transgén en el embrión se puede lograr mediante cualquier medio conocido en la técnica tal como, por ejemplo, microinyección, electroporación o lipofección). Por ejemplo, el transgén puede introducirse en un mamífero mediante microinyección de la construcción en los pronúcleos del (de los) óvulo(s) del mamífero fertilizado para provocar que una o más copias de la construcción se retengan en las células del (de los) mamífero(s) en desarrollo. Tras la introducción de la construcción transgénica en el óvulo fertilizado, el óvulo puede incubarse *in vitro* durante períodos de tiempo variables o reimplantarse en la hospedadora sustituta o ambos. La incubación *in vitro* hasta la madurez está dentro del alcance de esta divulgación. Un método común es incubar los embriones *in vitro* durante aproximadamente 1-7 días, dependiendo de la especie y a continuación, reimplantarlos en la hospedadora sustituta.

La reimplantación se logra utilizando métodos estándar. Habitualmente, se anestesia a la hospedadora sustituta y se insertan los embriones en el oviducto. El número de embriones implantados en una hospedadora particular variará según la especie, pero normalmente será comparable al número de crías que la especie produce de forma natural.

La infección retroviral también se puede utilizar para introducir un transgén en un r. El embrión no humano en desarrollo puede cultivarse *in vitro* al estadio de blastocisto. Durante este tiempo, los blastómeros pueden ser dianas para la infección retroviral (Jaenich, R. (1976) PNAS 73:1260-1264). La infección eficaz de los blastómeros se obtiene mediante tratamiento enzimático para eliminar la zona pelúcida (Manipifying the Mouse Embryo, Hogan eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1986). El sistema de vector vírico utilizado para introducir el transgén normalmente es un retrovirus con replicación defectuosa que porta el transgén (Jahner *et al.* (1985) PNAS 82:6927-6931; Van der Putten *et al.* (1985) PNAS 82:6148-6152).

Un tercer tipo de célula diana para la introducción de transgenes es la célula madre embrionaria (ES, por sus siglas en inglés). Los transgenes pueden introducirse eficazmente en las células ES mediante transfección de ADN o mediante transducción mediada por retrovirus. A continuación, tales células ES transformadas pueden combinarse con blastocistos de un roedor. Posteriormente, las células ES colonizan el embrión y contribuyen a la línea germinal del animal quimérico resultante.

Los animales transgénicos que comprenden C3 y/o C5 humanizados se pueden cruzar con otros animales. Una forma de preparación es generar una serie de mamíferos, cada uno de los cuales contiene una de las construcciones o transgenes deseados. Estos mamíferos se crían juntos mediante una serie de cruces, retrocruzamientos y selecciones, para generar en última instancia un único mamífero que contenga todas las construcciones y/o transgenes deseados, donde el mamífero es por lo demás congénito (genéticamente idéntico) al tipo silvestre excepto por la presencia de las construcciones y/o los transgenes deseados. En un caso, de esta manera se produce un ratón que comprende un gen C3 y/o C5 humano o humanizado.

Normalmente, el cruzamiento y el retrocruzamiento se logra apareando hermanos o una línea parental con una descendencia, dependiendo del objetivo de cada etapa particular en el proceso de mejora animal. En ciertos casos, puede ser necesario generar un gran número de descendientes para generar un único descendiente que contenga cada una de las construcciones nuligénicas y/o transgenes en la localización cromosómica adecuada. Además, puede ser necesario cruzar o retrocruzar varias generaciones para obtener finalmente el genotipo deseado.

Uso de animales no humanos con C3 y/o C5 humanizados para identificar compuestos capaces de modular el sistema del complemento

En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para identificar una molécula terapéutica candidata (es decir, un compuesto) capaz de modular la activación del complemento. El método utiliza cualquiera de los roedores con C5 humanizados (por ejemplo, ratones o ratas) descritos en el presente documento, que también pueden ser roedores con C3 humanizados. Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para identificar un compuesto capaz de modular la activación del complemento que comprende:

- a. administrar el compuesto al roedor o al ratón de la presente invención; y
- b. ensayar si la activación del complemento en el roedor o en el ratón está modulada, identificando así un compuesto capaz de modular la activación del complemento. En algunas realizaciones, los compuestos candidatos se administran directamente a los roedores después de la inducción experimental de la activación del complemento (por ejemplo, en un modelo de isquemia/reperfusión renal) y se evalúan los efectos de dichos compuestos con respecto a su capacidad para modular el sistema del complemento. En otras realizaciones, los compuestos candidatos se ponen en contacto con suero obtenido de estos animales y la actividad del complemento se evalúa utilizando cualquier técnica de evaluación *in vitro* utilizada habitualmente (tal como, aunque no de forma limitativa, ensayos de CH₅₀).

En algunas realizaciones, el compuesto candidato puede modular la activación del complemento reduciendo, disminuyendo o inhibiendo la activación del complemento. El compuesto puede reducir la activación del complemento

en cualquiera de los roedores descritos en este documento en un 1 %, un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 6 %, un 7 %, un 8 %, un 9 %, un 10 %, un 11 %, un 12 %, un 13 %, un 14 %, un 15 %, un 16 %, un 17 %, un 18 %, un 19 %, un 20 %, un 21 %, un 22 %, un 23 %, un 24 %, un 25 %, un 26 %, un 27 %, un 28 %, un 29 %, un 30 %, un 31 %, un 32 %, un 33 %, un 34 %, un 35 %, un 36 %, un 37 %, un 38 %, un 39 %, un 40 %, un 41 %, un 42 %, un 43 %, un 44 %, un 45 %, un 46 %, un 47 %, un 48 %, un 49 %, un 50 %, un 51 %, un 52 %, un 53 %, un 54 %, un 55 %, un 56 %, un 57 %, un 58 %, un 59 %, un 60 %, un 61 %, un 62 %, un 63 %, un 64 %, un 65 %, un 66 %, un 67 %, un 68 %, un 69 %, un 70 %, un 71 %, un 72 %, un 73 %, un 74 %, un 75 %, un 76 %, un 77 %, un 78 %, un 79 %, un 80 %, un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %, en comparación con los roedores de control a los que no se trata con el compuesto candidato.

En otra realización, el compuesto candidato puede reducir, disminuir o inhibir la activación del complemento hasta 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 42 horas, 48 horas, 54 horas, 60 horas, 66 horas, 72 horas, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días o tres semanas, inclusive (incluyendo cualquier período de tiempo entre estos valores).

El compuesto candidato puede modular aún más la activación del complemento en otras realizaciones aumentando, amplificando o activando la actividad del complemento. El compuesto puede aumentar la activación del complemento en cualquiera de los roedores divulgados en el presente documento en cualquiera de un 1 %, un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 6 %, un 7 %, un 8 %, un 9 %, un 10 %, un 11 %, un 12 %, un 13 %, un 14 %, un 15 %, un 16 %, un 17 %, un 18 %, un 19 %, un 20 %, un 21 %, un 22 %, un 23 %, un 24 %, un 25 %, un 26 %, un 27 %, un 28 %, un 29 %, un 30 %, un 31 %, un 32 %, un 33 %, un 34 %, un 35 %, un 36 %, un 37 %, un 38 %, un 39 %, un 40 %, un 41 %, un 42 %, un 43 %, un 44 %, un 45 %, un 46 %, un 47 %, un 48 %, un 49 %, un 50 %, un 51 %, un 52 %, un 53 %, un 54 %, un 55 %, un 56 %, un 57 %, un 58 %, un 59 %, un 60 %, un 61 %, un 62 %, un 63 %, un 64 %, un 65 %, un 66 %, un 67 %, un 68 %, un 69 %, un 70 %, un 71 %, un 72 %, un 73 %, un 74 %, un 75 %, un 76 %, un 77 %, un 78 %, un 79 %, un 80 %, un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %, en comparación con los roedores de control a los que no se trata con el compuesto candidato.

En otra realización, el compuesto candidato puede aumentar, amplificar o activar la actividad del complemento hasta 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 42 horas, 48 horas, 54 horas, 60 horas, 66 horas, 72 horas, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días o tres semanas, inclusive (incluyendo cualquier período de tiempo entre estos valores).

Los compuestos candidatos pueden ser, sin limitación, compuestos químicos de molécula pequeña, anticuerpos, proteínas, ácidos nucleicos inhibidores o cualquier combinación de los mismos.

1. Anticuerpos

En algunos aspectos, el compuesto candidato se une (tal como se une preferentemente) a una proteína del complemento (tal como, aunque no de forma limitativa, C5 o C3 (por ejemplo, C3a)) y es un anticuerpo. En algunas realizaciones, los anticuerpos son antagonistas de C5 y/o C3 y pueden disminuir la activación del complemento. En otras realizaciones, los anticuerpos son agonistas de C5 y/o C3 y pueden aumentar la activación del complemento.

También se pueden preparar variantes de anticuerpos basándose en información conocida en la técnica, sin afectar sustancialmente la actividad del anticuerpo. Por ejemplo, estas variantes de anticuerpo pueden tener al menos un resto de aminoácido en la molécula del anticuerpo reemplazado por un resto diferente. En el caso de los anticuerpos, los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen generalmente las regiones hipervariables, pero se contemplan también alteraciones de la región marco (FR, por sus siglas en inglés).

En el caso de los anticuerpos, un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). En general, la variante (o variantes) resultante seleccionada para el desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental a partir del cual se generan. Una manera conveniente para generar tales variantes de sustitución implica la maduración de la afinidad usando presentación en fagos. Brevemente, varios sitios de regiones hipervariables (por ejemplo, sitios 6-7) están mutados para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos así generados se presentan a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto génico III del M13 empaquetado en cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se cribaron a continuación en cuanto a su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se divulga en el presente documento. Con el fin de identificar los sitios de regiones hipervariables candidatos para la modificación, se puede realizar mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de regiones hipervariables que contribuyen significativamente a la unión al antígeno.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan

mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis mediante la PCR, y mutagénesis mediante casete de una variante preparada inicialmente o una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de los polipéptidos de inmunoglobulina descritos en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos, incluyendo la de una cisteína de la bisagra.

Las variantes de la región Fc con unión a C1q alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) se describen en la publicación de Solicitud de patente internacional n.º WO99/51642. Tales variantes pueden comprender una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones de aminoácidos de la región Fc. Véanse, también, Duncan y Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); la Patente de EE. UU. n.º 5.648.260; la Patente de EE. UU. n.º 5.624.821; y la publicación de Solicitud de patente internacional n.º WO94/29351 relativa a variantes de la región Fc.

2. Polipéptidos que no son anticuerpos

En algunos aspectos, el compuesto candidato se une (tal como se une preferentemente) a una proteína del complemento (tal como, C5 o C3 (por ejemplo, C3a)) y es un polipéptido que no es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el polipéptido que no es un anticuerpo es un antagonista de C5 y/o de C3 y puede disminuir la activación del complemento. En otras realizaciones, el polipéptido que no es un anticuerpo es un agonista de C5 y/o de C3 y puede aumentar la activación del complemento.

Los polipéptidos de unión pueden sintetizarse químicamente usando la metodología de síntesis de polipéptidos conocida o pueden prepararse y purificarse usando tecnología recombinante. Los polipéptidos de unión suelen tener al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 aminoácidos de longitud o más, en donde tales polipéptidos de unión que son capaces de unirse a una diana, tal como cualquiera de las proteínas del complemento (por ejemplo, C5 o C3) analizadas en el presente documento.

Tales polipéptidos de unión se pueden identificar sin experimentación excesiva usando técnicas bien conocidas. En este sentido, se observa que las técnicas para seleccionar bibliotecas de polipéptidos de unión que son capaces de unirse específicamente a una diana polipeptídica son bien conocidas en la materia (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; las solicitudes de publicaciones PCT WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:3998-4002 (1984); Geysen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 178-182 (1985); Geysen *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 102:259-274 (1987); Clackson, T. *et al.*, (1991) *Nature*, 352: 624; Kang, A.S. *et al.*, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8363 y Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668.

Los métodos para generar bibliotecas de péptidos y seleccionar estas bibliotecas también se divulgan en las Patentes de EE. UU. n.º 5.723.286, 5.432.018, 5.580.717, 5.427.908, 5.498.530, 5.770.434, 5.734.018, 5.698.426, 5.763.192 y 5.723.323.

Los polipéptidos de unión se pueden modificar para potenciar su efecto inhibidor y/o terapéutico (incluyendo, por ejemplo, la afinidad mejorada, propiedades farmacocinéticas mejoradas tales como la semivida, estabilidad y tasa de liquidación, toxicidad reducida, etc.). Dichas modificaciones incluyen, sin limitación, glucosilación, pegilación, sustitución con aminoácidos de origen no natural pero funcionalmente equivalentes, grupos enlazadores, etc.

3. Moléculas pequeñas

En algunos aspectos, el compuesto candidato se une (tal como se une preferentemente) a una proteína del complemento (tal como, C5 o C3 (por ejemplo, C3a)) y es una molécula pequeña. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es un antagonista de C5 y/o de C3 y puede disminuir la activación del complemento. En otras realizaciones, la molécula pequeña es un agonista de C5 y/o de C3 y puede aumentar la activación del complemento.

Las moléculas pequeñas son preferentemente moléculas orgánicas distintas de polipéptidos o anticuerpos de unión como se definen en el presente documento. Las moléculas pequeñas orgánicas pueden identificarse y sintetizarse químicamente utilizando una metodología conocida (véanse, por ejemplo, las solicitudes de publicaciones PCT WO 00/00823 y WO 00/39585). Las moléculas orgánicas son usualmente de menos de aproximadamente 2000 daltons de tamaño, como alternativa, de menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 o 200 daltons de tamaño, en donde tales moléculas orgánicas que son capaces de unirse a un polipéptido como se describe en el presente documento

pueden identificarse sin excesiva experimentación usando técnicas muy conocidas. En este sentido, se observa que las técnicas para seleccionar bibliotecas de moléculas pequeñas orgánicas para moléculas que son capaces de unirse a una diana polipeptídica son bien conocidas en la materia (véase, por ejemplo, las solicitudes de publicaciones PCT WO 00/00823 y WO 00/39585).

5

Las moléculas pequeñas orgánicas pueden ser, por ejemplo, aldehídos, cetonas, oximas, hidrazonas, semicarbazonas, carbazidas, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, hidrazinas N-sustituidas, hidracidas, alcoholes, éteres, tioles, tioéteres, disulfuros, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, ureas, carbamatos, carbonatos, cetales, tiocetales, acetales, tioacetales, haluros de arilo, aril sulfonatos, haluros de alquilo, alquil sulfonatos, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, anilinas, alquenos, alquinos, dioles, aminoalcoholes, oxazolidinas, oxazolininas, tiazolidinas, tiazolininas, enaminas, sulfonamidas, epóxidos, aziridinas, isocianatos, cloruros de sulfonylo, compuestos diazo, cloruros de ácido o similares.

10

En algunos aspectos, el compuesto químico de molécula pequeña es un componente de una biblioteca química combinatoria. Las bibliotecas químicas combinatorias son una colección de múltiples especies de compuestos químicos compuestos por subunidades o monómeros más pequeños. Las bibliotecas combinatorias vienen en una variedad de tamaños, que van desde unos pocos cientos hasta muchos cientos de miles de especies diferentes de compuestos químicos. También hay una variedad de tipos de bibliotecas, incluyendo bibliotecas oligoméricas y poliméricas compuestas de compuestos tales como carbohidratos, oligonucleótidos y moléculas pequeñas orgánicas, etc. Estas bibliotecas tienen una variedad de usos, tales como la inmovilización y la separación cromatográfica de compuestos químicos, así como usos para identificar y caracterizar ligandos capaces de unirse a una molécula diana (por ejemplo, C5 y/o C3) o mediar una actividad biológica de interés (tal como, aunque no de forma limitativa, inhibición o activación de la actividad del complemento).

15

20

25

En la técnica se conocen diversas técnicas para sintetizar bibliotecas de compuestos sobre soportes en fase sólida. Los soportes en fase sólida suelen ser objetos poliméricos con superficies funcionalizadas para unirse con subunidades o monómeros para formar los compuestos de la biblioteca. La síntesis de una biblioteca normalmente implica una gran cantidad de soportes en fase sólida. Para hacer una biblioteca combinatoria, los soportes en fase sólida se hacen reaccionar con una o más subunidades de los compuestos y con uno o más reactivos en una secuencia predeterminada cuidadosamente controlada de reacciones químicas. En otras palabras, las subunidades de la biblioteca se "cultivan" sobre los soportes en fase sólida. Cuanto más grande sea la biblioteca, mayor es el número de reacciones necesarias, complicando la tarea de realizar un seguimiento de la composición química de las múltiples especies de compuestos que componen la biblioteca. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas tienen un tamaño de menos de aproximadamente 2000 daltons, como alternativa, de menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 o 200 daltons de tamaño.

30

35

Los agentes de molécula pequeña descritos en cualquiera de los aspectos del presente documento pueden derivarse de cualquier tipo de reacción química que pueda llevarse a cabo sobre un soporte sólido. Tales reacciones químicas incluyen, pero sin limitación, cicloadiciones 2+2, incluyendo atrapamiento de butadieno; cicloadiciones [2+3], incluyendo síntesis de isoxazolininas, furanos y péptidos modificados; formación de acetal, incluyendo inmovilización de dioles, aldehídos y cetonas; condensación aldólica, incluyendo derivatización de aldehídos, síntesis de propanodiolos; condensación de benzoína, incluyendo derivatización de aldehídos; ciclocondensaciones, incluyendo benzodiazepinas e hidantoínas, tiazolidinas, miméticos de cambio, porfirinas, ftalocianinas; ciclación de Dieckmann, incluyendo ciclación de diésteres; Reacción de Diels-Alder, incluyendo derivatización del ácido acrílico; adición electrofílica, incluyendo adición de alcoholes a alquenos; reacción de Grignard, incluyendo derivatización de aldehídos; reacción de Heck, incluyendo síntesis de alquenos disustituidos; reacción de Henry, incluyendo síntesis de óxidos de nitrilo *in situ* (véase la cicloadición 2+3); hidrogenación catalítica, incluyendo síntesis de feromonas y péptidos (hidrogenación de alquenos); reacción de Michael, incluyendo síntesis de sulfanilcetonas, biciclo[2.2.2]octanos; reacción de Mitsunobu, incluyendo síntesis de éteres arílicos, peptidilfosfonatos y tioéteres; sustituciones aromáticas nucleofílicas, incluyendo síntesis de quinolonas; oxidación, incluyendo síntesis de aldehídos y cetonas; cicloadición de Pausen-Khand, incluyendo ciclación de norbornadieno con pentinol; ciclación fotoquímica, incluyendo síntesis de helicenos; reacciones con compuestos organometálicos, incluyendo derivatización de aldehídos y cloruros de acilo; reducción con hidruros complejos y compuestos de estaño, incluyendo reducción de carbonilo, ácidos carboxílicos, ésteres y grupos nitro; reacción de Soai, incluyendo reducción de grupos carboxilo; reacciones de Stille, incluyendo síntesis de derivados de bifenilo; reacción de Stork, incluyendo síntesis de ciclohexanonas sustituidas; aminación reductora, incluyendo síntesis de quinolonas; reacción de Suzuki, incluyendo síntesis de derivados del ácido fenilacético; y reacciones de Wittig-Horner, incluyendo reacciones de aldehídos, feromonas y sulfanilcetonas.

40

45

50

55

Las referencias que divulgan la síntesis de bibliotecas químicas, así como la desconvolución de los compuestos individuales de esas bibliotecas en soportes de fase sólida individuales, pueden encontrarse en la solicitud de Patente de EE. UU. n.º 2009/0032592; Needels *et al.*, (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10700-10704; y la solicitud de publicación PCT n.º WO 97/15390.

60

4. Ácidos nucleicos inhibidores

65

En un aspecto de la presente invención, el compuesto modulador del complemento candidato es uno o más

oligonucleótidos dirigidos a un componente (tal como un ARNm) del sistema del complemento. El ácido nucleico diana puede ser, sin limitación, cualquiera de los oligonucleótidos antisentido, un pequeño ARN inhibidor (ARNip) o una ribozima.

El oligonucleótido de la invención puede ser un ARNm que codifica un componente proteico del sistema del complemento. Los oligonucleótidos se unirán a los ARNm e interferirán con sus funciones, mediando en su destrucción o impidiendo la traducción a proteínas. No se requiere una complementariedad absoluta, aunque se prefiere. Una secuencia de oligonucleótidos "complementaria" a una porción de un ARN, como se cita en el presente documento, significa una secuencia que tiene suficiente complementariedad para poder hibridarse con el ARN, formando un dúplex estable. La capacidad de hibridar dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del oligonucleótido. En general, cuanto más largo sea el ácido nucleico de hibridación, más desajustes de bases con un ARN puede contener y aun así formar un dúplex estable. Los expertos en la técnica pueden determinar un grado tolerable de falta de coincidencia mediante el uso de procedimientos estándar para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

En general, los oligonucleótidos complementarios fabricados para hibridarse con ARNm de proteínas del sistema del complemento se dirigen a cualquier región del ARNm, incluyendo la región 5' no traducida del ARNm, al complemento del codón de inicio AUG o a la región 3' no traducida.

Los oligonucleótidos pueden tener enlaces internucleosídicos alternativos, tales como, aunque no de forma limitativa, fosforotioato (Mag *et al.*, Nucleic Acids Res. 19:1437-1441, 1991; y la Patente de EE.UU. n.º 5.644.048), ácido peptídico nucleico o PNA (Egholm, Nature, 368:566-568, 1993; y la Patente de EE.UU. n.º 6.656.687), fosforamida (Beaucage, Methods Mol. Biol. 20:33-61, 1993), fosforoditioato (Capaldi *et al.*, Nucleic Acids Res., 28:E40, 2000). Otros análogos de oligonucleótidos incluyen tales como, aunque no de forma limitativa, morfolino (Summerton, Biochim. Biophys. Acta, 1489:141-158, 1999), oligonucleótidos bloqueados (Wahlestedt *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:5633-5638, 2000), ácidos nucleicos peptídicos o PNA (Nielsen *et al.*, 1993; Hyrup y Nielsen, 1996) u oligonucleótidos de los extremos 5' y 3' modificados con 2-o-(2-metoxi)etilo (McKay *et al.*, J. Biol. Chem., 274:1715-1722, 1999). Los ácidos nucleicos pueden contener cualquier combinación de desoxirribo- y ribonucleótidos y cualquier combinación de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc.

El complementario puede comprender al menos un resto de base modificada que se selecciona del grupo que incluye, entre otros, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico de ácido uracilo-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N2-carboxipropil)uracilo, (acp3)_w y 2,6-diaminopurina.

Los oligonucleótidos complementarios también pueden comprender al menos un resto de azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye, aunque no de forma limitativa, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

Los oligonucleótidos complementarios deben tener al menos diez nucleótidos de longitud y pueden variar de 10 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, tal como 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud.

Evaluación de la eficacia de los compuestos candidatos

La eficacia terapéutica de compuestos moduladores del complemento candidatos, las dosis y métodos adecuados de la presente invención en un roedor determinado, por ejemplo, un ratón o una rata, se pueden determinar de acuerdo con ensayos del complemento bien conocidos por los expertos habituales en la materia. La ruta del complemento genera numerosos productos específicos durante el curso normal de la activación y se han desarrollado ensayos sensibles y específicos que están disponibles comercialmente para la mayoría de estos productos de activación, incluyendo los fragmentos activación pequeños C3a, C4a y C5a y los fragmentos de activación grandes Bb y sC5b-9. La mayoría de estos ensayos utilizan anticuerpos monoclonales que reaccionan con nuevos antígenos expuestos en el fragmento del complemento, pero no sobre las proteínas naturales a partir de las que se forman, haciendo que estos ensayos sean muy simples y específicos. La tecnología ELISA es particularmente común, aunque también se utiliza el radioinmunoensayo (RIA) para la detección de C3a y C5a. Estos últimos ensayos miden tanto los fragmentos no procesados como sus fragmentos procesados (es decir, las formas principales encontradas en la circulación). La medición de C3a proporciona un indicador sensible independiente de la ruta de activación del complemento. La detección del producto de activación de la ruta de ataque a la membrana en fase líquida, sC5b-9, proporciona la evidencia de que el complemento se ha activado hasta su finalización. Además, la ruta clásica también genera C4a, cuya medición proporciona información sobre la actividad del inhibidor de C3b y si dicho inhibidor está activando la ruta clásica.

Además, varios modelos de activación del complemento *in vivo* también están disponibles para el personal experto en la materia para evaluar la capacidad de un compuesto candidato para modular el sistema del complemento. Por ejemplo, el sistema del complemento está implicado en la lesión por isquemia-reperfusión que se produce después de un evento isquémico y la posterior restauración del flujo sanguíneo. Entre los ejemplos de lesiones que pueden causar lesión por isquemia-reperfusión se incluyen, sin limitación, infarto de miocardio, eventos isquémicos cerebrales, isquemia intestinal y muchos aspectos de la cirugía vascular, cirugía cardíaca, traumatismos y trasplantes. La activación del sistema del complemento juega un papel en los eventos inflamatorios de la lesión por isquemia-reperfusión. La lesión por isquemia produce alteraciones de la membrana celular, afectando a lípidos, carbohidratos o proteínas de la superficie externa de modo, que estos epítomos expuestos se alteran y pueden actuar como neoantígenos (autoantígenos modificados). La participación de la ruta clásica del complemento en la lesión por isquemia-reperfusión se evidencia en ratones genéticamente deficientes en C3 o C4 que muestran igual protección contra la lesión local en un modelo de lesión en las extremidades posteriores y en un modelo animal (Austen *et al.* (2003) *Int J Immunopath Pharm* 16:1). Adicionalmente, también se ha demostrado que la activación del complemento está implicada en un modelo renal de lesión isquémica (Guo *et al.* (2005) *Ann Rev Immunol* 23:821).

La invención puede entenderse mejor con referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Reemplazo del gen C5 endógeno de ratón por un gen C5 humano

El gen C5 humano de 97 kb que contiene los exones codificantes 2 a 42 del gen C5 humano reemplazó 75,8 kb del locus del gen C5 murino que abarca los exones codificantes 2 a 41 e incluye una porción de la región no traducida 3'. Véase la Figura 1.

Se construyó una construcción de direccionamiento para reemplazar el gen C5 de ratón con el humano en una sola etapa de direccionamiento utilizando la tecnología de ingeniería genética de VelociGene® (véase Valenzuela *et al.* (2003) *High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis*, *Nature Biotech*, 21(6):652-659). El ADN de C5 de ratón y humano se obtuvo a partir de clones de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) bMQ-2277L16 y CTD-2559I19, respectivamente. Brevemente, una construcción de direccionamiento linealizada generada mediante clonación de reparación de huecos que contiene brazos de homología aguas arriba y aguas abajo de C5 de ratón que flanquean una secuencia C5 humana de 97 kb que se prolonga desde el intrón 1 justo aguas arriba del exón codificante 2 hasta el exón codificante 41 y la región no traducida 3' (coordenadas genómicas: GRCh38: chr9:120,952,335-121,050,276 (- cadena)) y un casete de selección de neo floreado, se electroporaron en células madre embrionarias (ES) de ratón F1H4 (híbrido C57BL/6 x 129 F1). Las células ES correctamente dirigidas (MAID 7140) se electroporaron adicionalmente con un vector transitorio que expresa Cre para eliminar el casete de selección de fármacos. Los clones de células ES dirigidas sin el casete de fármacos (MAID 7141) se introdujeron en un embrión de ratón SW en una etapa de 8 células mediante el método VelociMouse® (véanse, las Patentes de EE. UU. n.º 7.294.754, 7.576.259, 7.659.442 y Poueymirou *et al.* (2007) *F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses* *Nature Biotech.* 25(1):91-99). Los VelociMice® (ratones F0 totalmente derivados de la célula ES donante) que portaban el gen C5 humanizado se identificaron mediante genotipado de la pérdida de alelo de ratón y la ganancia de alelo humano usando una modificación del ensayo de alelos (véase Valenzuela *et al.* (2003)).

Los clones de células ES correctamente dirigidos se identificaron mediante un ensayo de pérdida de alelos nativos (LONA, por sus siglas en inglés) (Valenzuela *et al.* 2003), en el que el número de copias del gen de C5 nativo sin modificar se determinó mediante dos reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas (qPCR) TaqMan™ específicas para las secuencias en el gen C5 de ratón que se direccionaron para delección. Los ensayos de qPCR comprendieron los siguientes conjuntos de cebador-sonda (escritos de 5' a 3'): cebador directo en dirección 5', CCTCCGGTTA ACTGGTTTGT GAT (SEQ ID NO:1); cebador inverso en dirección 5', GCAGTGAATG GTAGACTTCC CA (SEQ ID NO:2); sonda en dirección 5', FAM-AGTGACTTTA CTTTGTTGT TCTGCTCACA-BHQ (SEQ ID NO:3); cebador directo en dirección 3', CCGGGAAGG AAACCAAGAC (SEQ ID NO:4); cebador inverso en dirección 3', CAGCACAGAC TGAGGATCCA A (SEQ ID NO:5); sonda en dirección 3', FAM-AGACTGTCAT TCTGGCCCGG ACCT-BHQ (SEQ ID NO:6); en los que FAM se refiere a la sonda fluorescente de 5-carboxifluoresceína y BHQ se refiere al desactivador de fluorescencia del tipo desactivador de agujeros negros (Biosearch Technologies). El ADN purificado a partir de clones de células ES que han adoptado el vector de direccionamiento y lo han incorporado en sus genomas se combinó con la Gene Expression Master Mix TaqMan™ (Life Technologies), de acuerdo con las sugerencias del fabricante en una placa de PCR de 384 pocillos (Optical 384-Well Reaction Plate MicroAmp™, Life Technologies) y se sometieron a ciclos en un Prism 7900HT de Applied Biosystems, que recoge los datos de fluorescencia durante el curso de las PCR y determina un ciclo umbral (Ct), el ciclo de PCR fraccionario en el que la fluorescencia acumulada alcanza un umbral preestablecido. Para cada muestra de ADN se ejecutaron las qPCR específicas de C5 en dirección 5' y en dirección 3' y dos qPCR para genes de referencia no dirigidos. Se calcularon

las diferencias en los valores de Ct (ΔCt) entre cada qPCR específica de C5 y cada qPCR de gen de referencia y a continuación, se calculó la diferencia entre cada ΔCt y la mediana de ΔCt para todas las muestras analizadas para obtener valores de $\Delta\Delta Ct$ para cada muestra. El número de copias del gen C5 en cada muestra se calculó a partir de la siguiente fórmula: número de copias = $2 \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Un clon correctamente dirigido, que haya perdido una de sus copias nativas, tendrá un número de copias del gen C5 igual a uno. La confirmación de que la secuencia del gen C5 humano reemplazó la secuencia del gen C5 de ratón eliminada en el alelo humanizado se confirmó mediante un ensayo de qPCR TaqMan™ que comprende los siguientes conjuntos de cebador-sonda (escritos de 5' a 3'): cebador directo en dirección 5' humano, TGCTCTTAAA GGACCATCAT CAC (SEQ ID NO:7); cebador inverso en dirección 5' humano, GTAAACGGAT AACGGAAAGG ATAGA (SEQ ID NO:8); sonda en dirección 5' humana, FAM-CCATTTCCAA ATGCACTTCC CAGC-BHQ (SEQ ID NO:9); cebador directo en dirección 3' humano, CCCACTGAAC TATCACAGGA AACA (SEQ ID NO:10); cebador inverso en dirección 3' humano, GGAGATGCAT TCCAGTCTCT GTTA (SEQ ID NO:11); sonda en dirección 3' humana, FAM-TGAAGATGAC CTCCGGATGT AACGG-BHQ (SEQ ID NO:12).

El mismo ensayo LONA se utiliza para analizar el ADN purificado a partir de biopsias de cola de ratones derivados de las células ES diana para determinar sus genotipos de C5 y confirmar que el alelo C5 humanizado se ha transmitido a través de la línea germinal. Se crían dos crías heterocigotas para el reemplazo para generar un ratón que sea homocigoto para el reemplazo del gen C5 endógeno de ratón por el gen C5 humano. Para el fenotipado se utilizan crías que son homocigotas para el reemplazo.

La unión en dirección 5' del locus murino y la secuencia que contiene el gen C5 humano está diseñada para estar dentro de 5'-TGAAAAACCT CCATTACTAC TTCTACAGAT GCCCAGAGTG GTCTTGCATT CTATCCTTGT/(GCGATCGC)/ TCTGCCATCT CCTACTAGGC ATGTGGGGAA GGGAATTCA GATGATGGTT GGAAATCTGG AAATTCTTTC CTCTCTTTTG TAATTTGCCT (SEQ ID NO:13), en donde el nucleótido C5 final de ratón antes del primer nucleótido del gen C5 humano es la última T en CTTGT y el primer nucleótido de la secuencia de C5 humano es la primera T en TCTGC, que abarcan el sitio de AsiSI (entre paréntesis), en donde las uniones precisas se indican mediante barras diagonales. La unión en dirección 3' de la secuencia que contiene el gen C5 humano y el casete de selección de neo floxeado está diseñada para estar dentro de 5'-GCAAATAGGG CAGGCCACAG TGGCCTAATT AACCCACAAT GCAGCTGTCA AATATCAAAG AAGGTTTTGT GAATTAGCCT/CTCGAGATAA CTTCGTATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT ATGCATGGCC TCCGCGCCGG GTTTTGGCGC CTCCGCGGG (SEQ ID NO:14), en donde el nucleótido final de la secuencia C5 humana es la T en AGCCT y el primer nucleótido del casete de selección de neo floxeado es la primera C en CTCGA, indicándose la unión precisa mediante una barra diagonal. La unión en dirección 3' de la secuencia del locus C5 murino está diseñada para estar dentro de 5'-ATGTCTGGAA TAACTTCGTA TAATGTATGC TATACGAAGT TATGCTAGTA ACTATAACGG TCCTAAGGTA GCGAGCTAGC/CAGGCTATTA GGCTTCTGTC CCCAACTGTG GTGGCAAATA GGCCAGACCA CAGTCACCAG ATGAAGCCAT AAATGCAGCT (SEQ ID NO:15), en donde el nucleótido final del casete de selección de neo floxeado es la segunda C en CTCAG y el primer nucleótido del locus C5 murino es la primera C en CAGGC, indicándose la unión precisa mediante una barra diagonal. La unión en dirección 3' de la secuencia que contiene el gen C5 humano y el locus murino está diseñada para estar dentro de 5'-GCAAATAGGG CAGGCCACAG TGGCCTAATT AACCCACAAT GCAGCTGTCA AATATCAAAG AAGGTTTTGT GAATTAGCCT/CTCGAG(ATAA CTTCGTATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT) GCTAGTAACT ATAACGGTCC TAAGGTAGCG AGCTAGC/CA GGCTATTAGG CTTCTGTCCC CAACTGTGGT GGCAAATAGG CCAGACCACA GTCACCAGAT GAAGCCATAA ATGCAGCTGA (SEQ ID NO:16), en donde el nucleótido final de la secuencia C5 humana está con la "T" en AGCCT y el primer nucleótido de la secuencia C5 de ratón es la primera "C" en CAGGC; que abarcan un sitio loxP (entre paréntesis) que permanece después de la extracción del casete de selección neo floxeado, en donde las uniones precisas se indican mediante barras diagonales.

Ejemplo 2

Reemplazo del gen C3 endógeno de ratón por un gen C3 humano

Versión 1 - Reemplazo con el promotor de C3 humano y los exones codificantes del 1 al 41

El gen C3 humano, que contiene elementos reguladores 5' y todos los exones codificantes 1 a 41 del gen C3 humano, reemplazó el locus del gen C5 murino que abarca los elementos reguladores 5' y todos los exones codificantes 2 a 41. Los métodos descritos anteriormente en el Ejemplo 1 se usaron básicamente para reemplazar las secuencias del gen C3 de ratón con secuencias del gen C3 humano. Véase la Figura 2A.

De manera preliminar, se generó una delección dirigida de 25 kb del gen C3 de ratón en células ES de ratón mediante el reemplazo de los exones codificantes 2 a 41 y que incluye 900 pb en 3' con respecto al sitio de poliadenilación con un casete de neo floxeado. Las células ES de ratón resultantes, células ES 12132, son un nuligénico para C3 heterocigoto. Se usaron células 12132 para generar ratones nuligénicos para C3 de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica.

Se generó una construcción de direccionamiento que contenía brazos de homología aguas arriba y aguas abajo de C3 de ratón, que flanqueaban una secuencia de C3 humana que se prolonga desde los elementos reguladores 5' aguas arriba del exón codificante 1 hasta el exón codificante 41 y la región no traducida 3' y un casete de selección

de higo floxeadado y se electroporó en células ES 12132. Las células ES correctamente dirigidas (MAID 6148) se electroporaron adicionalmente con un vector transitorio que expresa Cre para eliminar el casete de selección de fármacos. Los clones de células ES dirigidos sin casete de fármacos (MAID 6149) se introdujeron en un embrión de ratón en estadio de 8 células. Los ratones F0 totalmente derivados de la célula ES donante que portaba el gen C3 humanizado se identificaron mediante genotipado para pérdida del alelo de ratón y ganancia de alelo humano, como se describe en el Ejemplo 1.

La confirmación de que el casete de neo floxeadado reemplazó la secuencia del gen C3 de ratón eliminada en las células ES 12132 nuligénicas para C3 se confirmó mediante un ensayo de qPCR TaqMan™, que comprende los siguientes conjuntos de cebador-sonda (escritos de 5' a 3'): 12132TU, intrón 1 de C3 de ratón: cebador directo, GGCCTGATTA CATGGACCTG TC (SEQ ID NO:17); cebador inverso, CCCAGGCTTG GCTGGAATG (SEQ ID NO:18); sonda, FAM-TGTCCACTCT GGAAGCCCAG GC-BHQ (SEQ ID NO:19); 12132TD, 3' del exón 41 de C3 de ratón: cebador directo, GCCAGGAGAG GAAGCTGGAG (SEQ ID NO:20); cebador inverso, TGGCTCAGCA GTAAAGAACA C (SEQ ID NO:21); sonda, FAM-ACAGATTGCT GTGAGCTGCC CAAA-BHQ (SEQ ID NO:22); casete de neo: cebador directo, GGTGGAGAGG CTATTCGGC (SEQ ID NO:23); cebador inverso, GAACACGGCG GCATCAG (SEQ ID NO:24); sonda, FAM-TGGGCACAAC AGACAATCGG CTG-BHQ (SEQ ID NO:25).

La confirmación de que la secuencia del gen C3 humano reemplazó la secuencia del gen C3 de ratón eliminada en el alelo humanizado se confirmó mediante un ensayo de qPCR TaqMan™ que comprende los siguientes conjuntos de cebador-sonda (escritos de 5' a 3'): mC3-1, promotor de C3 de ratón: cebador directo, GCCAGCCTAG CCTACTTCA (SEQ ID NO:26); cebador inverso, GCCACCCATC CCAGTTCT (SEQ ID NO:27); sonda, FAM- CAGCCCAGGC CCTTTAGATT GCA-BHQ(SEQ ID NO:28); mC3-2, región no traducida 3' de C3 de ratón, cebador directo, TACGGTGTTA GGTTCACTAT TGGT (SEQ ID NO:29); cebador inverso, GTCGCCAGCA GTCTCATACA G (SEQ ID NO:30); sonda, CAL Orange-AGTGGGCATC CCTTGCCAGG C-BHQ(SEQ ID NO:31); casete de higo: cebador directo, TGCGGCCGAT CTTAGCC (SEQ ID NO:32); cebador inverso, TTGACCGATT CCTTGCCG (SEQ ID NO:33); sonda, FAM-ACGAGCGGGT TCGGCCATT C-BHQ (SEQ ID NO:34); hC3-1, promotor de C3 humano: cebador directo, GGGCCTCCTA AGTTTGTGTA GTATC (SEQ ID NO:35); cebador inverso, CAGGGCTGGT TCCCTAGAAA TC (SEQ ID NO:36); sonda, FAM-TACAATAGCA GGCACAGCAC CCA-BHQ (SEQ ID NO:37); hC3-2, intrón 1 de C3 humano: cebador directo, GGCTGAGAGT GGGAGTCATG (SEQ ID NO:38); cebador inverso, GCACTTGCCA ATGCCATTAT C (SEQ ID NO:39); sonda, FAM-CTGCTGTCCT GCCCATGTGG TTG-BHQ (SEQ ID NO:40); hC3-3, exón 41 de C3 humano: cebador directo, CGAATGCCAA GACGAAGAGA AC (SEQ ID NO:41); cebador inverso, GGGCACCCAA AGACAACCAT (SEQ ID NO:42); sonda, CAL Orange-CAGAAACAAT GCCAGGACCT CGGC-BHQ (SEQ ID NO:43).

El mismo ensayo LONA se utiliza para analizar el ADN purificado a partir de biopsias de cola de ratones derivados de las células ES diana para determinar sus genotipos de C3 y confirmar que el alelo C3 humanizado se había transmitido a través de la línea germinal. Se crían dos crías heterocigotas para el reemplazo para generar un ratón que sea homocigoto para el reemplazo del gen C3 endógeno de ratón por el gen C3 humano. Para el fenotipado se utilizan crías que son homocigotas para el reemplazo.

Las secuencias de la unión del locus C3 murino y la secuencia que contiene el gen C3 humano, la unión de la secuencia que contiene el gen C3 humano y el casete de selección de higo floxeadado y la unión de la secuencia del casete de selección de higo floxeadado y el locus C3 murino, se determinan como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

Versión 2 - Reemplazo con exones codificantes 2 al 41 de C3 humano

El gen C3 humano que contiene los exones codificantes 2 a 41 del gen C3 humano reemplazó el locus del gen C5 murino que abarca los exones codificantes 2 a 41. Los métodos descritos anteriormente en el Ejemplo 1 se usaron básicamente para reemplazar las secuencias del gen C3 de ratón con secuencias del gen C3 humano. Véase la Figura 2B.

De manera preliminar, se generó una delección dirigida de 25 kb del gen C3 de ratón en células ES de ratón mediante el reemplazo de los exones codificantes 2 a 41 y que incluye 900 pb en 3' con respecto al sitio de poliadenilación con un casete de neo floxeadado. Las células ES de ratón resultantes, células ES 12132, son un nuligénico para C3 heterocigoto.

Se generó una construcción de direccionamiento que contenía brazos de homología aguas arriba y aguas abajo de C3 de ratón, que flanqueaban una secuencia de C3 humana que se prolonga desde el exón codificante 2 hasta el exón codificante 41 y la región no traducida 3' y un casete de selección de higo floxeadado y se electroporó en células ES 12132. Las células ES correctamente dirigidas (MAID 6155) se electroporaron adicionalmente con un vector transitorio que expresa Cre para eliminar el casete de selección de fármacos. Los clones de células ES dirigidos sin casete de fármacos (MAID 6156) se introdujeron en un embrión de ratón en estadio de 8 células. Los ratones F0 totalmente derivados de la célula ES donante que portaba el gen C3 humanizado se identificaron mediante genotipado para pérdida del alelo de ratón y ganancia de alelo humano, como se describe en el Ejemplo 1.

La confirmación de que el casete de neo floxeadado reemplazó la secuencia del gen C3 de ratón eliminada en las células ES 12132 nuligénicas para C3 y que la secuencia del gen C3 humano reemplazó la secuencia del gen C3 de ratón eliminada en el alelo humanizado, se confirmó mediante un ensayo de qPCR TaqMan™ que comprende los mismos conjuntos de cebador-sonda (escritos de 5' a 3') como se ha descrito anteriormente en la Versión 1.

El mismo ensayo LONA se utiliza para analizar el ADN purificado a partir de biopsias de cola de ratones derivados de las células ES diana para determinar sus genotipos de C3 y confirmar que el alelo C3 humanizado se había transmitido a través de la línea germinal. Se crían dos crías heterocigotas para el reemplazo para generar un ratón que sea homocigoto para el reemplazo del gen C3 endógeno de ratón por el gen C3 humano. Para el fenotipado se utilizan crías que son homocigotas para el reemplazo.

Las secuencias de la unión del locus C3 murino y la secuencia que contiene el gen C3 humano, la unión de la secuencia que contiene el gen C3 humano y el casete de selección de higo floxeadado y la unión de la secuencia del casete de selección de higo floxeadado y el locus C3 murino, se determinan como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3

Ensayo de actividad hemolítica del complemento en suero de ratón

Se ha implicado al complemento en enfermedades inflamatorias oculares y degenerativas de la retina (véase Mullins *et al.* (2000) Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease, FASEB J, 14(7):835-846). El bloqueo de la escisión de C5 por anticuerpo monoclonal (mAb) es una posible estrategia terapéutica para estos trastornos (véase Copland *et al.* (2009) Systemic and local anti-C5 therapy reduces the disease severity in experimental autoimmune uveoretinitis, Clinical and Experimental Immunology, 159:303-314). Para la evaluación de terapias dirigidas al complemento, tal como antagonistas de C5 y/o de C3, son necesarios ensayos para evaluar la función de los agentes terapéuticos candidatos *in vitro* e *in vivo* en modelos adecuados de enfermedades, trastornos y afecciones humanas asociados con la activación del complemento.

Métodos

La actividad hemolítica del complemento se evaluó mediante el ensayo del complemento clásico de CH₅₀ (Gilcas *et al.* (2001) Classical pathway evaluation, Current Protocols in Immunology, Unit 13.1). Se recogió sangre de ratón del corazón y se coaguló en tubos Eppendorf en hielo durante 1 hora; el suero se separó por centrifugación y se almacenó a -70 °C. Los eritrocitos de oveja (E) se sensibilizaron mediante incubación con hemolisina anti-oveja de conejo durante 20 minutos a 37 °C. Las células sensibilizadas (E_A) se incubaron durante 1 hora a 37 °C con diluciones al doble de suero tratado o control de ratón o humano. Las células E_A intactas se sedimentaron y se eliminó el sobrenadante para medir la absorbancia a 541 nm, un índice de hemólisis. Las células E_A incubadas solo con tampón (0 % de lisis) o con ddH₂O (100 % de lisis) sirvió como controles negativo y positivo respectivamente. El porcentaje de hemólisis y CH₅₀ en cada pocillo se calcularon en relación con el control de ddH₂O (Holt *et al.* (2001) Targeted deletion of the CD59 gene causes spontaneous intravascular hemolysis and hemoglobinuria, Blood, 98(2):442-449). Los ratones, incluyendo C5^{hu/hu}, C5^{-/-}, C3^{hu/hu}, C3^{-/-} y las cepas de control respectivas, se generaron con la tecnología Velocigene®, como se ha descrito en los Ejemplos 1 y 2. Los sueros humanos normales, empobrecidos en C5 y empobrecidos en C3 se obtuvieron de Quidel Corp. y se utilizaron como controles o para comparación. Se añadieron componentes del complemento para probar si se puede restaurar la función de hemólisis. Los sueros analizados se incubaron durante 40 minutos a 4 °C con componentes del complemento; C5 humana (Sigma-Aldrich o Quidel Corp., 50 µg/ml), C3 humana (Sigma-Aldrich o Quidel Corp., 10, 400, 1200 µg/ml) y C5 murina (Regeneron Pharmaceuticals, 50 µg/ml). Se utilizaron mAb anti-C5 humano (100 µg/ml) y mAb anti-C5 de ratón (Hycult Biotech, 10 µg/ml) para confirmar la especificidad y la utilidad de este sistema para futuros descubrimientos de fármacos.

Resultados

Los sueros de ratón de tipo silvestre tienen aproximadamente 10 veces menor actividad hemolítica del complemento, en comparación con los sueros humanos normales. Como se muestra en la Fig. 3, la actividad hemolítica del complemento, según lo determinado utilizando el valor de CH₅₀, fue al menos 10 veces menor en tres lotes de sueros de ratón normales o de tipo silvestre en comparación con dos lotes de sueros humanos.

Los anticuerpos monoclonales anti-C5 bloquean la hemólisis de forma específica de especie. Como se muestra en la Fig. 4, un anticuerpo monoclonal anti-C5 de ratón (mC5Ab) bloqueó la actividad hemolítica del complemento en suero normal de ratón y un mAb anti-C5 humano (C5Ab) bloqueó la actividad hemolítica en suero humano normal y en suero humano empobrecido en C5 suplementado con proteína C5 humana, pero no en suero de ratón normal.

Las proteínas C5 y C3 humanas muestran actividad hemolítica específica de especie. Como se muestra en la Fig. 5A, las proteínas C5 y C3 humanas pudieron reconstituir la actividad hemolítica del complemento del suero humano empobrecido en C5 y C3, respectivamente.

Como se muestra en la figura 5B, los sueros de ratones C5^{-/-} y C3^{-/-} mostraron una falta de actividad del complemento y el suero de ratón C5^{hu/hu} humanizado no mostró actividad hemolítica, esencialmente equivalente al suero de los ratones C5^{-/-} y C3^{-/-}. La adición de proteína C5 de ratón al suero de ratón C5^{hu/hu} humanizado rescató la actividad hemolítica del complemento, pero la adición de proteína C5 humana al suero de ratón C5^{hu/hu} humanizado no rescató la actividad del complemento.

Como se muestra en la Fig. 5C, la falta de actividad hemolítica del complemento del suero de ratón C5^{hu/hu} humanizado no parece deberse a una falta de proteína C5 humana, dado que la cantidad de proteína C5 humana presente en el suero de estos ratones era aproximadamente un tercio de la cantidad de proteína C5 presente en el suero humano normal. La Fig. 5D muestra la variación entre ratones machos y hembras con C5 humanizados con respecto a los niveles del complemento C5 previos a la dosis. El intervalo de proteína C5 humana presente en el suero de estos ratones varió de 20 a 100 µg/ml, lo cual fue suficiente para mostrar actividad hemolítica en suero. La C5 humana añadida normalmente en estos experimentos fue de 50 µg/ml.

Se requieren proteínas C5 y C3 humanas para reconstituir la actividad hemolítica en sueros nuligénicos para C5 de ratón. Como se muestra en la Fig. 6, la actividad hemolítica del complemento no se pudo recuperar añadiendo proteína C5 humana al suero de ratón C5^{-/-}, si bien la adición de proteínas humanas C3 y C5 juntas rescató la hemólisis en el suero de ratón C5^{-/-}.

La adición de proteína C3 humana rescata la actividad hemolítica en el suero de ratón C5^{hu/hu}. Como se muestra en la Fig. 7, la proteína C3 humana es suficiente para reconstituir la actividad hemolítica del complemento en suero de ratones C5^{hu/hu}.

Basándose en los resultados anteriores, los ratones C5^{hu/hu} y/o C3^{hu/hu} humanizados son animales no humanos adecuados para evaluar la PK y PD de antagonistas de C5 y/o de C3 específicos de humanos. Basándose en los resultados anteriores, el suero de ratón C5^{hu/hu} y C3^{hu/hu} doblemente humanizado puede mostrar actividad hemolítica del complemento sin un requisito de suplementación con proteínas C5 y/o C3 humanas, constituyendo así una cepa de ratón adecuada para pruebas *in vivo* de la eficacia terapéutica de antagonistas C5 y/o C3 específicos de humanos.

Conclusiones

El suero de ratón de tipo silvestre tiene una actividad hemolítica del complemento dramáticamente menor en comparación con el suero humano. Los ratones modificados genéticamente que expresan C5 humano son nuligénicos funcionales para C5 murina, posiblemente porque la convertasa de ratón no puede escindir la proteína C5 humana. El suero de ratón con C5 humanizado necesita la adición de proteína C3 humana para alcanzar niveles naturales de actividad hemolítica del complemento.

Ejemplo 4

Usos de ratones con C5 y/o C3 humanizados

Los ratones con C5 y/o C3 humanizados son útiles para evaluar la farmacodinámica (PD) de compuestos C5 y/o C3 específicos de humanos (tales como, antagonistas, por ejemplo, anticuerpos neutralizantes anti-C5 o anti-C3).

Los ensayos de farmacocinética (PK) y PD en ratones con C5 y/o C3 humanizados se realizan según procedimientos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. n.º 6.355.245 para un anticuerpo anti-C5.

Los ratones con C5 y/o C3 humanizados son útiles para probar la eficacia terapéutica *in vivo* de los antagonistas de C5 o C3 específicos de humanos, por ejemplo, anticuerpos neutralizantes anti-C5 o anti-C3, en una variedad de modelos de enfermedades, por ejemplo y sin limitación: degeneración macular relacionada con la edad (AMD, por sus siglas en inglés) seca; AMD húmeda; uveoretinitis autoinmune experimental (EAU, por sus siglas en inglés); hipertensión ocular; y lesión del nervio óptico. (Véanse, por ejemplo, Makrides (1998) y Molnes *et al.* (2006) para una lista de enfermedades, trastornos y afecciones asociados con la activación del complemento).

La AMD seca puede inducirse en ratones humanizados C5 y/o C3 mediante una dieta rica en grasas y daño por luz azul (véase, por ejemplo, Exp Eye Res. 2002, 75(5):543-553), humo de cigarrillo (véase, por ejemplo, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006, 47(2):729-737), carboxietilpirrol (CEP) (véase, por ejemplo, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2010, 51:1276-1281; Nat Med. 2012, 18(5):791-798).

Los ratones con C5 y/o C3 humanizados también pueden criarse con otros modelos de AMD transgénicos, tales como, por ejemplo, ApoE(-/-) (véase, por ejemplo, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2000, 41:2035-2042), Mdm1 (véase, por ejemplo, Hum. Mol. Genet. 2008, 17:3929-3941), Sod1(-/-) (véase, por ejemplo, PNAS 2006, 103:11282-11287), LDLR(-/-) (véase, por ejemplo, Br J Ophthalmol 2005, 89:1627-1630) y DICER1 (-/-) (véase, por ejemplo, Nature. 2011; 471(7338):325-330).

La AMD húmeda puede inducirse en ratones con C5 y/o C3 humanizados mediante neovascularización coroidea (CNV, por sus siglas en inglés) inducida por láser (véase, Nat Protoc. 2013, 8(11):2197-2211).

- 5 La EAU se puede inducir en ratones con C5 y/o C3 humanizados (véase, por ejemplo, Clin Exp Immunol. 2010, 159(3): 303-314).

La hipertensión ocular se puede inducir en ratones con C5 y/o C3 humanizados (véanse, por ejemplo, Experimental Eye Research 2006, 83:620-628).

- 10 La lesión del nervio óptico se puede inducir en ratones con C5 y/o C3 humanizados (véase, por ejemplo, J Neurotrauma 2003, 20(9):895-904).

- 15 Los ratones con C5 humanizados se pueden utilizar para evaluar antagonistas de C5 específicos de humanos en una variedad de modelos de enfermedades, por ejemplo y sin limitación: hematuria paroxística nocturna; neuromielitis óptica; trasplante renal; y lesión renal. (Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. n.º 6355245).

- 20 Los ensayos de eficacia terapéutica utilizando ratones con C5 y/o C3 humanizados se realizan de acuerdo con procedimientos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. n.º 6.355.245 para un anticuerpo anti-C5.

Ejemplo 5

- 25 **Estudio farmacocinético/farmacodinámico de un anticuerpo anti-C5 en ratones con C5 humanizados homocigotos**

Este ejemplo utiliza ratones homocigotos con C5 humanizados machos y hembras preparados de acuerdo con los Ejemplos anteriores, para probar la capacidad de un anticuerpo anti-C5 para disminuir la activación del complemento.

Métodos

- 30 En el estudio se utilizó un total de 25 ratones C5^{hu/hu} (machos y hembras). Se recogió suero (20 µl) de dos ratones en cada punto temporal designado, que incluía un punto temporal "predosis", así como puntos temporales a las 3 h, 6 h, 1 d, 2 d, 4 d, 1 sem., 2 sem., 4 sem. después de la administración subcutánea de 15 mg/kg de un anticuerpo monoclonal anti-C5 humano. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta que se analizó la alteración farmacocinética (PK) y farmacodinámica (PD) de la activación del complemento.

- 40 La actividad hemolítica del complemento se evaluó como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 3. Como anteriormente, se añadió C3 humana (Sigma-Aldrich o Quidel Corp., 400 y 800 µg/ml) al suero para recapitular el sistema del complemento humano.

Resultados

- 45 Como se muestra en la Fig. 8, la inyección subcutánea de 15 mg/kg de un anticuerpo anti-C5 humano disminuye la activación del complemento durante al menos una semana tras la inyección. Este efecto se observó independientemente de si se añadieron 400 µg/ml (Figura 8A) u 800 µg/ml (Figura 8B) de proteína C3 humana a los ensayos hemolíticos.

- 50 Como se muestra en la Fig. 9, el análisis PK del anticuerpo monoclonal C5 reveló la eliminación de este anticuerpo con el tiempo, con 2 de 5 ratones teniendo niveles indetectables para el día 28.

Ejemplo 6

- 55 **Actividad cruzada de las proteínas del complemento humanas y de ratón**

- Este ejemplo investigó la actividad cruzada de las proteínas C3 y C5 humanas y de ratón utilizando los ratones modificados genéticamente descritos en los ejemplos anteriores. Como se analiza en el Ejemplo 3 y como se muestra en la Fig. 6, las proteínas C5 humana y C3 de ratón no son suficientes para reconstituir la actividad hemolítica en ratones que carecen de C5 endógeno. En este estudio, se observó la capacidad de C5 de ratón y de C3 humana para restaurar la actividad hemolítica en ratones nuligénicos para C3.

Métodos

- 65 La actividad hemolítica del complemento se evaluó como se ha descrito en el Ejemplo 3.

Los ratones, que incluyen C5^{-/-}, C3^{-/-} y las cepas de control respectivas, se generaron con la tecnología Velocigene®,

como se ha descrito en los Ejemplos 1 y 2. Los sueros humanos normales empobrecidos en C3 se obtuvieron de Quidel Corp. y se utilizaron como controles o para comparación. Se añadieron componentes del complemento para probar si se puede restaurar la función de hemólisis. Los sueros analizados se incubaron durante 40 minutos a 4 °C con componentes del complemento; C3 humana (Sigma-Aldrich o Quidel Corp., 50, 100, 500, 1200 µg/ml); y C5 humano (Sigma-Aldrich o Quidel Corp., 50 µg/ml). Se utilizaron mAb anti-C5 humano (100 µg/ml) y mAb anti-C5 de ratón (Hycult Biotech, 10 µg/ml) para confirmar la especificidad y la utilidad de este sistema para futuros descubrimientos de fármacos.

Resultados

Como se muestra en la Fig. 10A, la adición de proteína C3 humana al suero de ratones de tipo silvestre puede mejorar la función hemolítica con respecto a la observada en los controles de tipo silvestre. Sin embargo, en comparación con la adición de proteína C3 humana nuevamente al suero humano empobrecido en C3, la mejora observada es menor que la mostrada en seres humanos. Además, como se ilustra en la Fig. 10B, el porcentaje de hemólisis se restablece utilizando suero de ratón C5^{hu/hu} humanizado suplementado con proteína C3 humana.

Cuando este experimento se repitió usando sueros derivados de animales nuligénicos para C3, se demostró que añadir proteína C3 humana al suero de C3^{-/-} rescata la función hemolítica, particularmente con concentraciones crecientes de C3 humana añadida (Figura 11).

Por el contrario, la Figura 12 muestra que la adición de C3 humana a sueros derivados de animales de C5 nula no rescata la función hemolítica.

Conclusiones

Resumiendo, los datos derivados del presente ejemplo demuestran que, si bien la C3 humana puede reaccionar de forma cruzada con la C5 murina, la C3 de ratón asimismo es incapaz de reaccionar de forma cruzada con la C5 humana para recapitular la actividad del complemento *in vitro*. En la Tabla 1, más adelante, se presenta un resumen de estos resultados.

Tabla 1: Sumario de la actividad cruzada de C3, C5 de ratón y humana

ratón	+ humana	Actividad del complemento de la ruta clásica
TS	C3	> TS
TS	C5	
TS	C3, C5	
C3KO	C3	= TS
C3KO	C5	
C3KO	C3, C5	= TS
C5KO	C3	0
C5KO	C5	0
C5KO	C3, C5	≥ TS

REIVINDICACIONES

1. Un roedor, cuyo genoma comprende un reemplazo de una secuencia del gen C5 de roedor en un locus C5 endógeno de roedor con una secuencia del gen C5 humano para formar un gen C5 modificado, en donde la expresión del gen C5 modificado está bajo control de elementos reguladores de roedor en el locus C5 endógeno de roedor y da como resultado la proteína C5 humana en el suero de roedor y en donde la secuencia del gen C5 humano comprende los exones codificantes 2 a 41 de un gen C5 humano.
2. El roedor de la reivindicación 1, en donde la proteína C5 humana está en el suero de roedor en un nivel de al menos 20 µg/ml.
3. El roedor de la reivindicación 1, en donde el roedor es un ratón o una rata.
4. El roedor de la reivindicación 1, en donde el roedor es un ratón, la secuencia génica de roedor que se reemplaza comprende los exones codificantes 2 a 41 del gen C5 de ratón y el gen C5 modificado comprende el exón codificante 1 del gen C5 endógeno de ratón y los exones codificantes 2 a 41 del gen C5 humano.
5. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el roedor es un ratón que es incapaz de expresar una proteína C5 de ratón.
6. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el roedor es un ratón que expresa una proteína C3 de ratón codificada por un gen C3 endógeno de ratón.
7. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el roedor es un ratón que comprende un reemplazo de una secuencia del gen C3 de ratón en un locus C3 endógeno de ratón con una secuencia del gen C3 humano que comprende uno o más exones del gen C3 humano.
8. Un ratón, cuyo genoma comprende un reemplazo de una secuencia del gen C5 de ratón que comprende codificar los exones 2 a 41 del gen C5 de ratón en un locus C5 endógeno de ratón con una secuencia del gen C5 humano que comprende codificar los exones 2 a 41 de un gen C5 humano para formar un gen C5 modificado, en donde el gen C5 modificado está unido operativamente a secuencias o elementos reguladores de ratón en el locus C5 endógeno de ratón; y
 - (i) un reemplazo de una secuencia del gen C3 de ratón que comprende codificar los exones 1 a 41 del gen C3 de ratón en un locus C3 endógeno de ratón con una secuencia del gen C3 humano que comprende codificar los exones 1 a 41 de un gen C3 humano para formar un gen C3 modificado o
 - (ii) un reemplazo de una secuencia del gen C3 de ratón que comprende codificar los exones 2 a 41 del gen C3 de ratón en un locus C3 de ratón endógeno con una secuencia del gen C3 humano que comprende codificar los exones 2 a 41 de un gen C3 humano para formar un gen C3 modificado, en donde el gen C3 modificado está unido operativamente a secuencias o elementos reguladores de ratón en el locus C3 endógeno de ratón.
9. Un método para preparar un roedor humanizado, que comprende reemplazar una secuencia del gen C5 de roedor en un locus C5 endógeno de roedor con una secuencia del gen C5 humano que comprende codificar los exones 2 a 41 de un gen C5 humano para formar un gen C5 modificado, en donde el gen C5 modificado está operativamente unido a secuencias o elementos reguladores de roedores en el locus C5 endógeno de roedor.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el roedor es un ratón o una rata.
11. El método de la reivindicación 9, en donde el roedor es un ratón, la secuencia del gen C5 de roedor que se reemplaza comprende los exones codificantes 2 a 41 del gen C5 de ratón y el gen C5 modificado comprende el exón codificante 1 del gen C5 endógeno de ratón y los exones codificantes 2 a 41 del gen C5 humano.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde el reemplazo se logra introduciendo la secuencia del gen C5 humano en células madre embrionarias (ES) de roedor, que obtiene una célula ES de roedor humanizada en la que la secuencia del gen C5 de roedor en el locus C5 endógeno de roedor se ha reemplazado por la secuencia del gen C5 humano y que prepara un roedor humanizado usando la célula ES de roedor humanizada.
13. Un método para identificar un compuesto capaz de modular la activación del complemento que comprende:
 - a. administrar el compuesto al roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o al ratón de la reivindicación 8; y
 - b. ensayar si la activación del complemento en el roedor o en el ratón está modulada, identificando así un compuesto capaz de modular la activación del complemento.
14. El método de la reivindicación 13, en donde el compuesto es un compuesto químico de molécula pequeña.

15. El método de la reivindicación 13, en donde el compuesto es un anticuerpo o una proteína.

16. El método de la reivindicación 13, en donde el compuesto es un ácido nucleico inhibidor.

5 17. Una célula madre embrionaria de roedor, que comprende un reemplazo de una secuencia del gen C5 de roedor en un locus C5 endógeno de roedor con una secuencia del gen C5 humano para formar un gen C5 modificado, en donde la expresión del gen C5 modificado está bajo control de elementos reguladores de roedor en el locus C5 endógeno de roedor, y en donde la secuencia del gen C5 humano comprende los exones codificantes 2 a 41 de un gen C5 humano.

10

18. Un embrión de roedor, que comprende la célula madre embrionaria de roedor de la reivindicación 17.

FIGURA 1

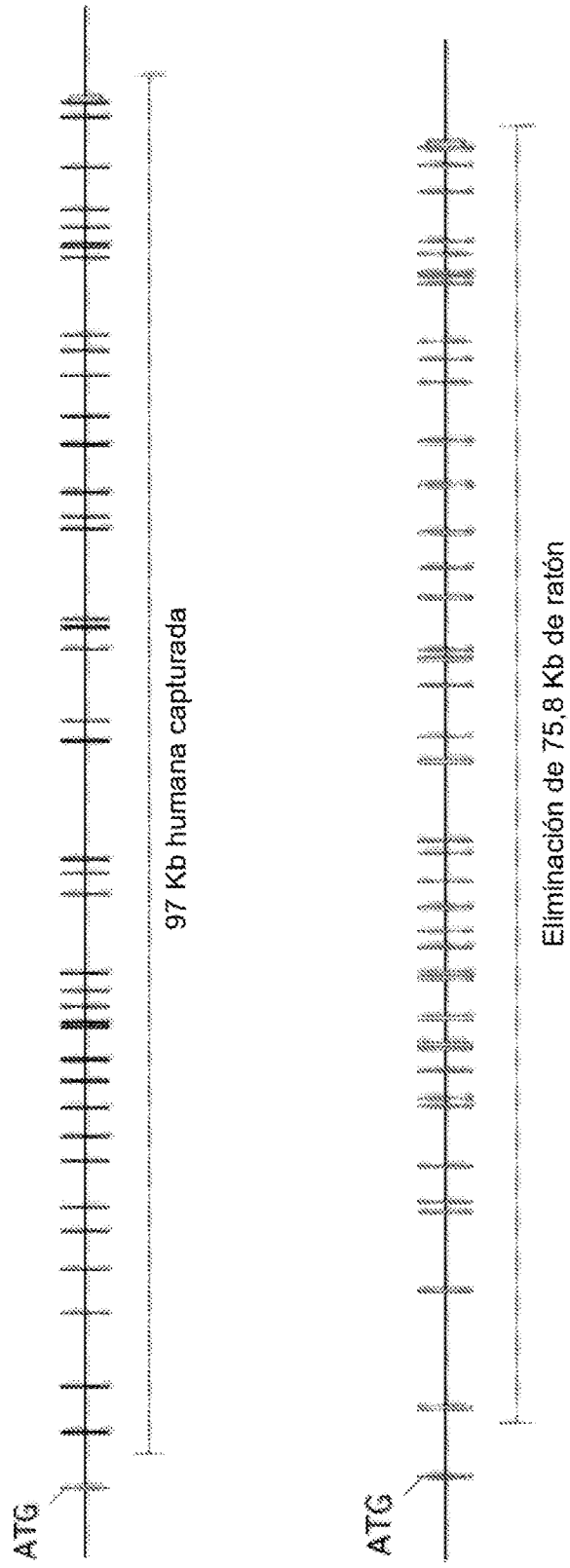


FIGURA 2A

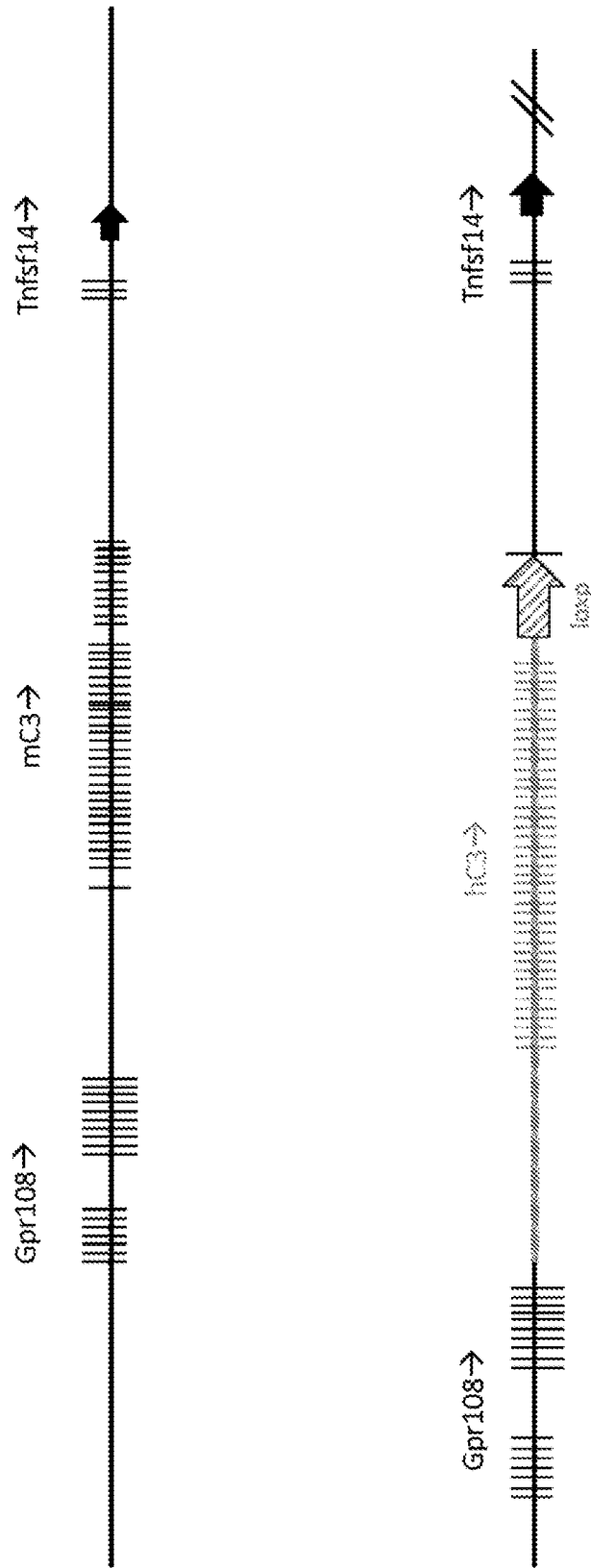


FIGURA 2B

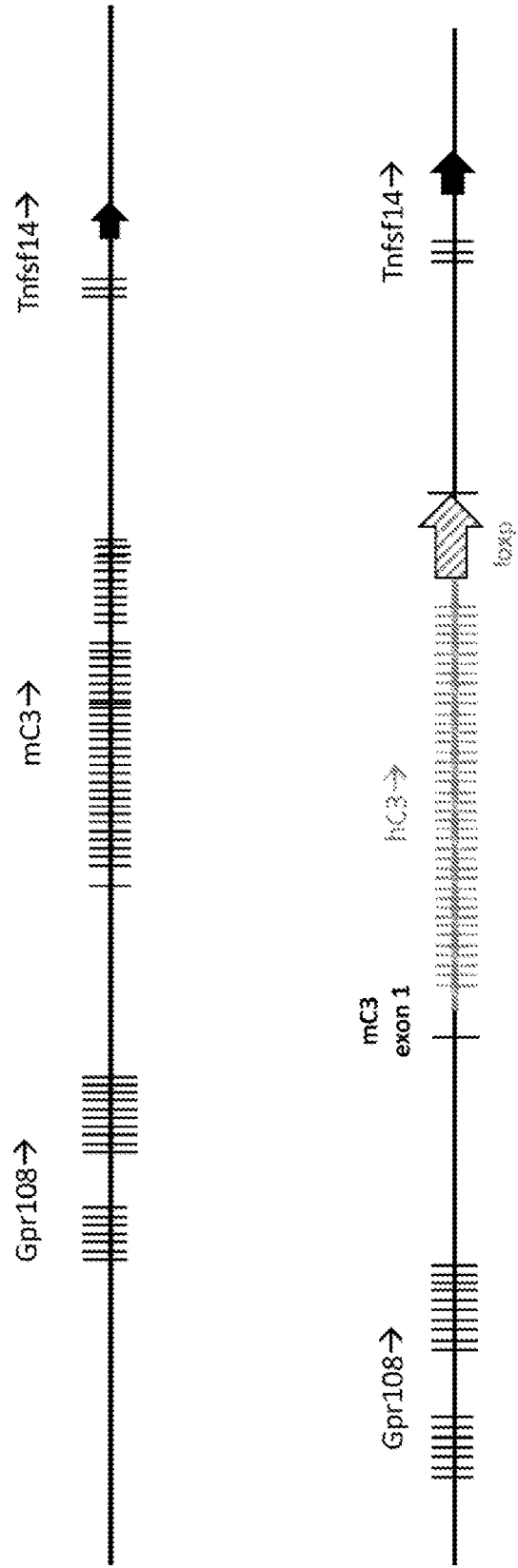


FIGURA 3

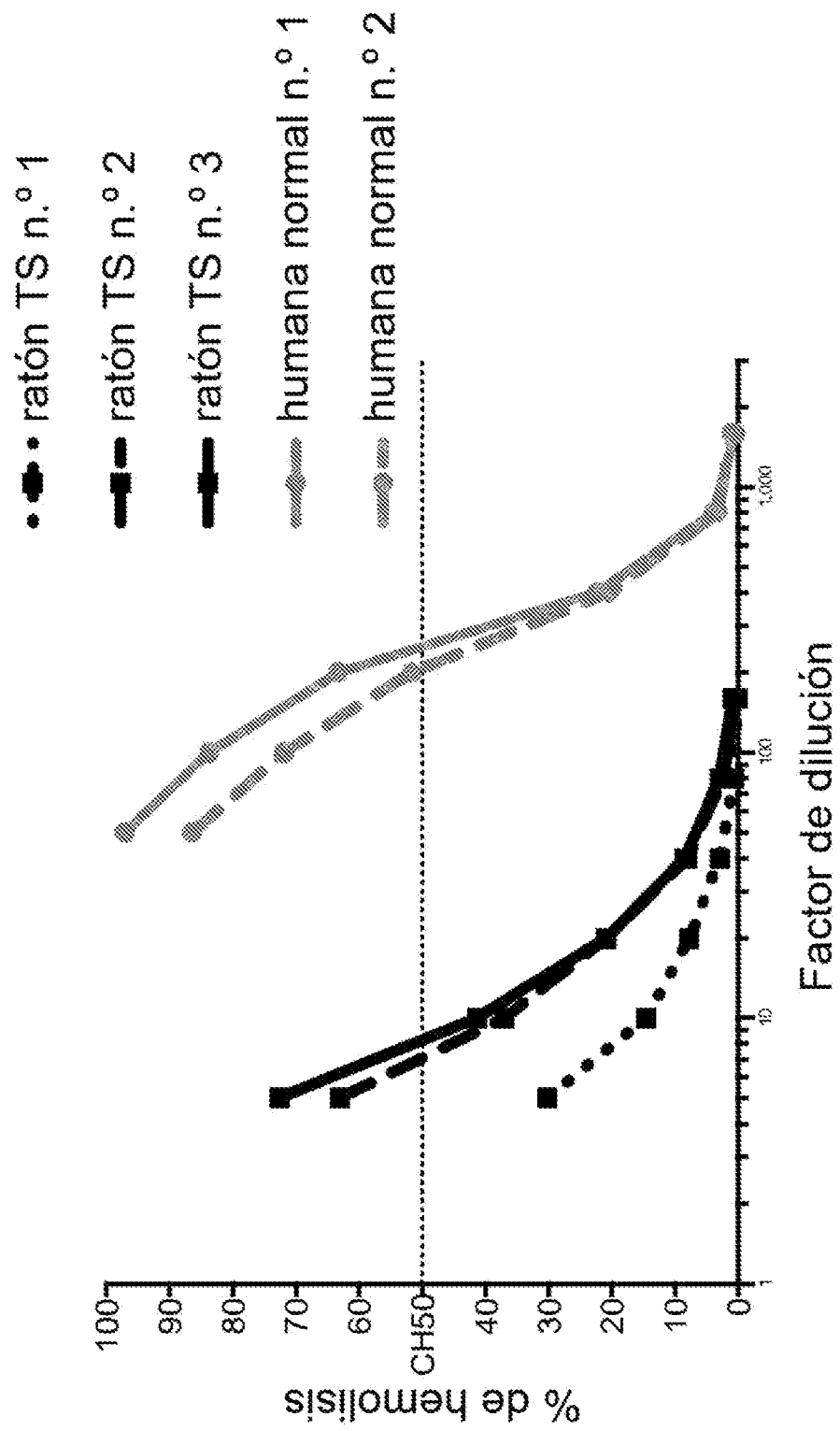


FIGURA 4

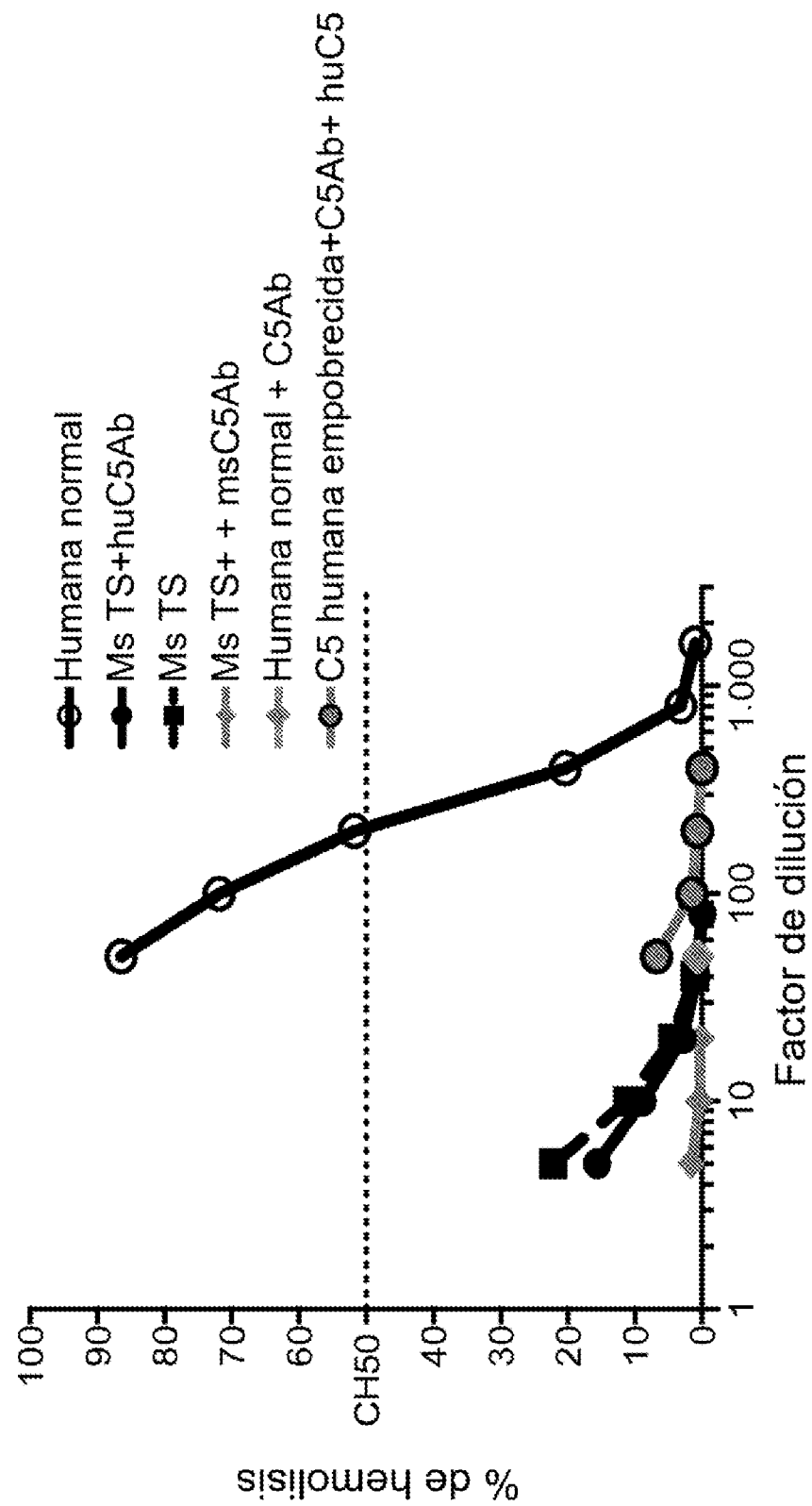


FIGURA 5A

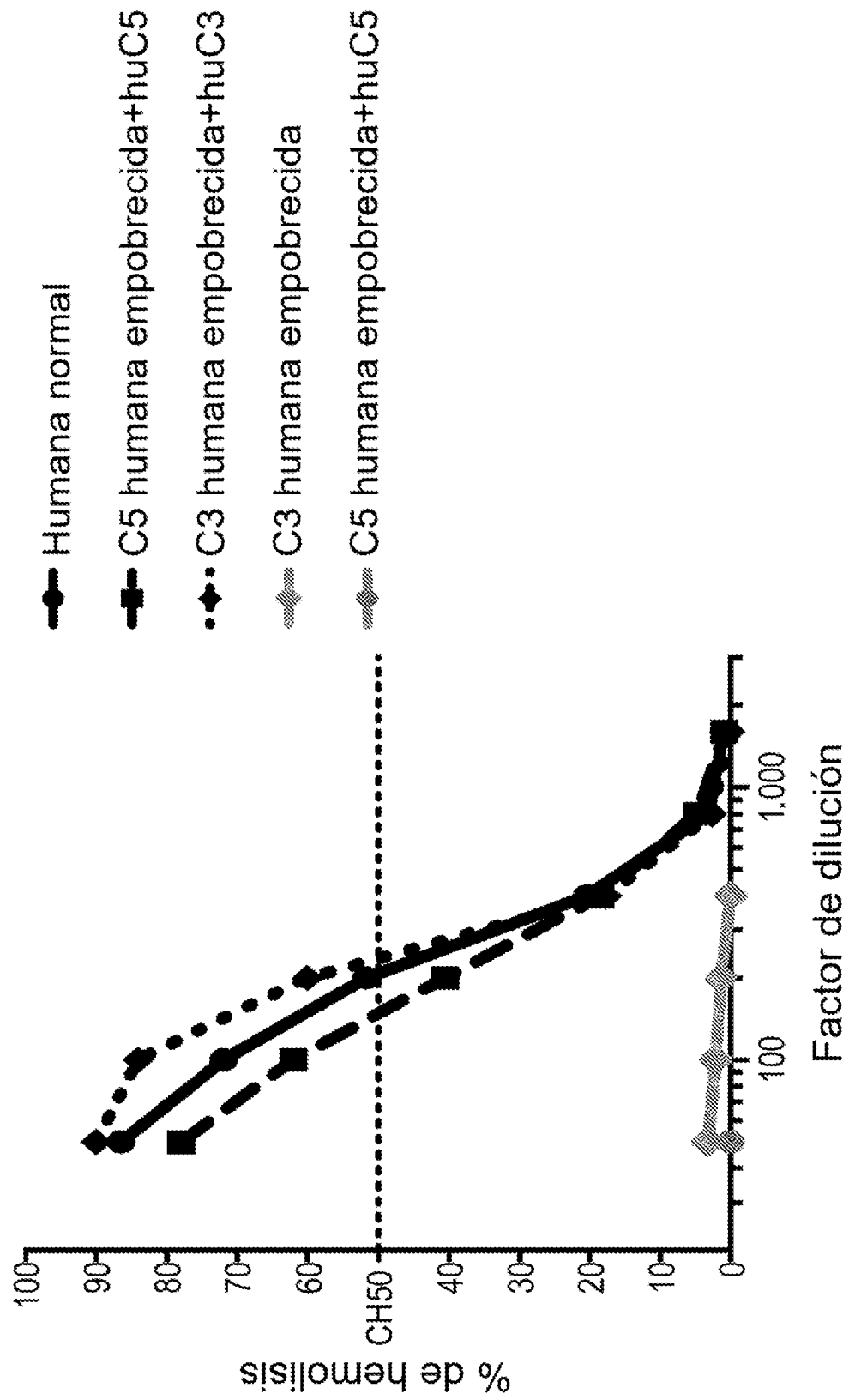


FIGURA 5B

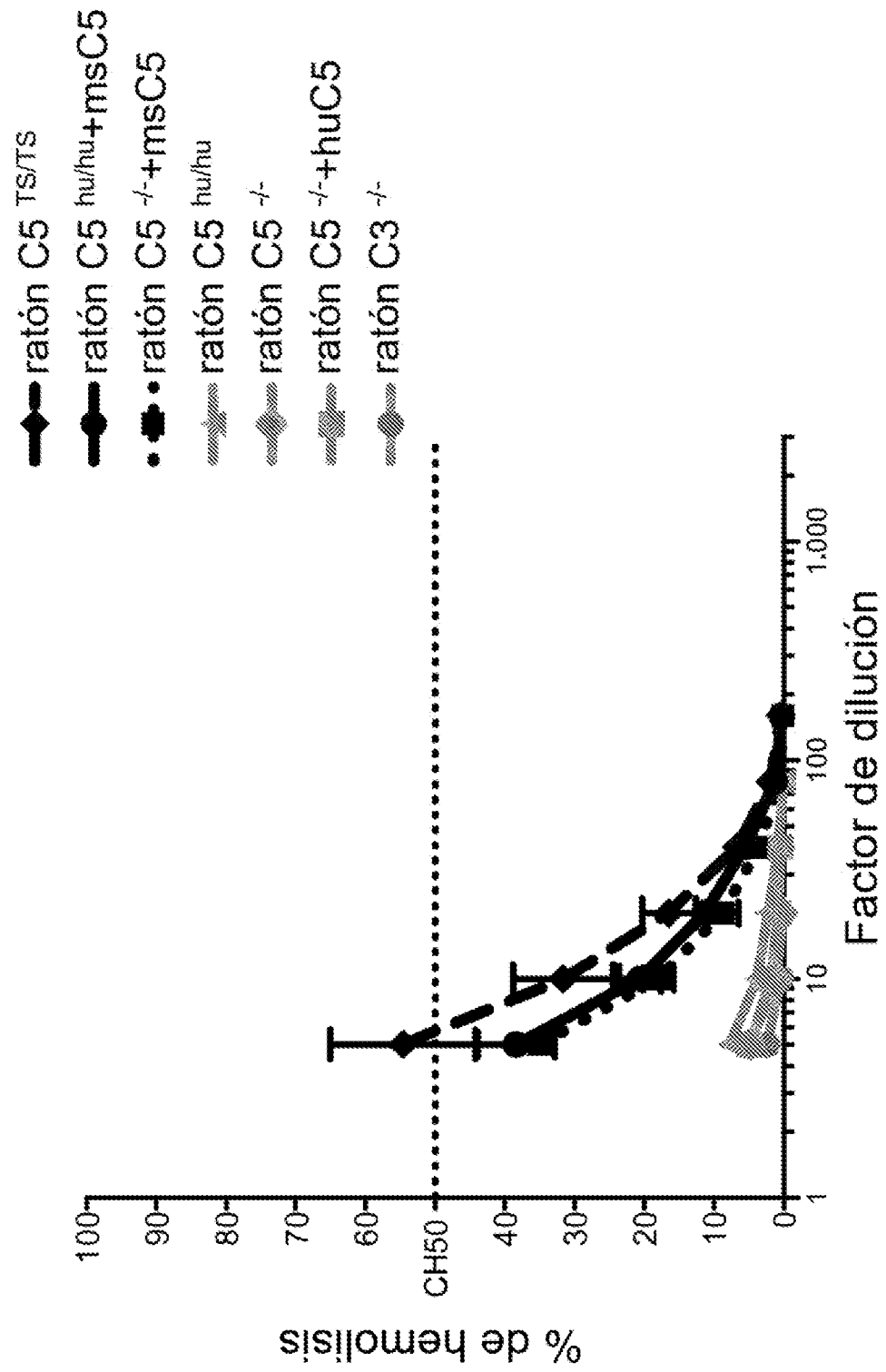


FIGURA 5C

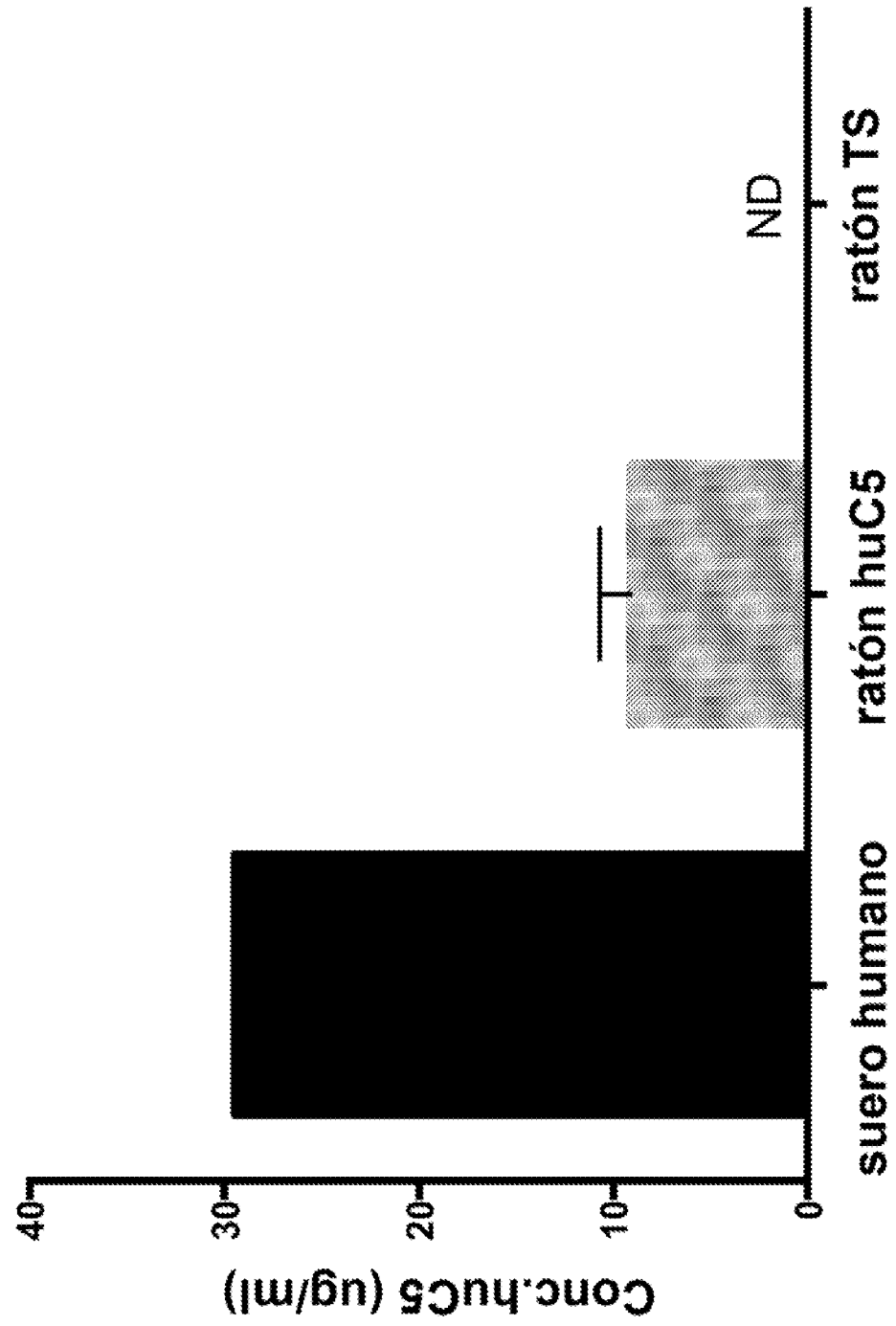
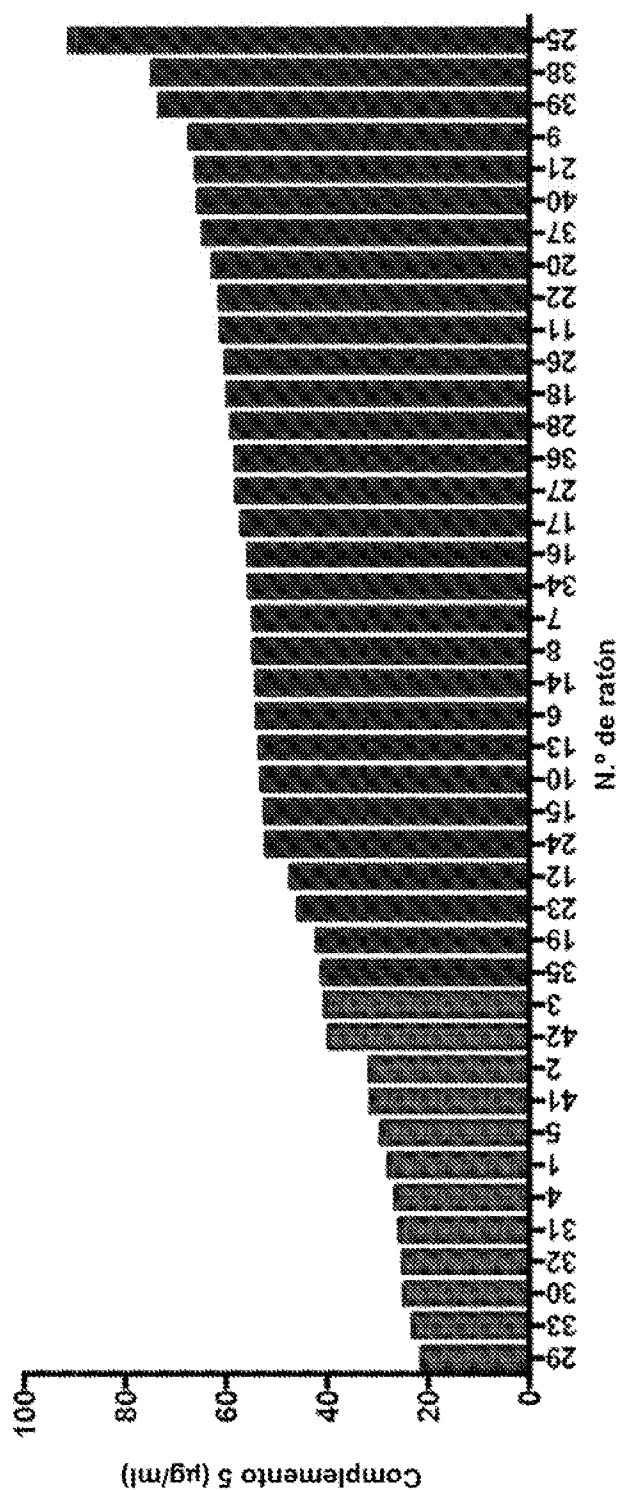


FIGURA 5D

Niveles de C5 previos a la dosis en ratones que expresan C5 humana



Promedio global: 48,98 µg/ml ($\pm 15,09$ D.T.)

Promedio **femenino**: 28,80 µg/ml ($\pm 6,17$ D.T.)

Promedio **masculino** (excluyendo el n.º 25): 58,46 µg/ml ($\pm 9,98$ D.T.)

FIGURA 6

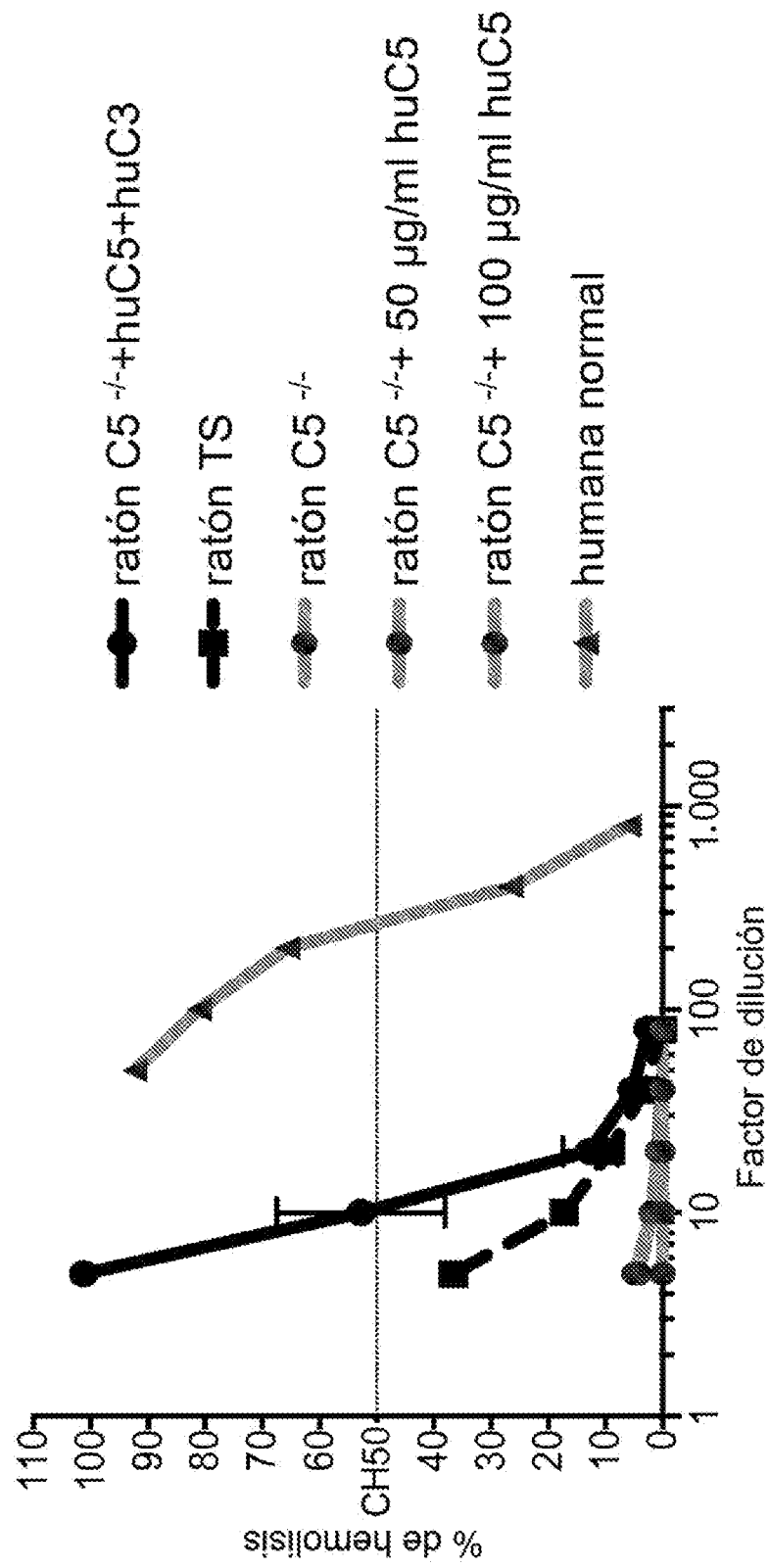


FIGURA 7

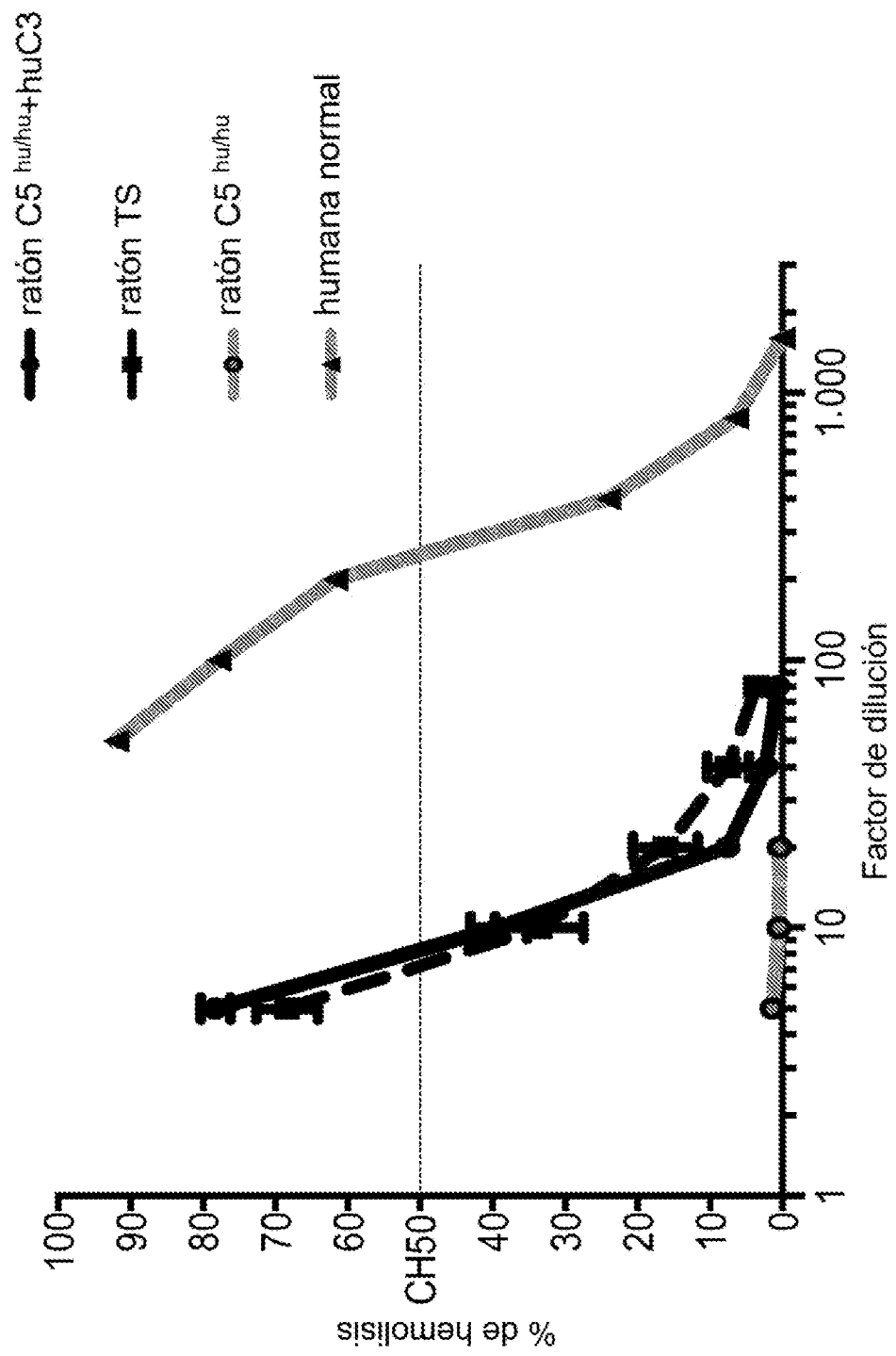


FIGURA 8A

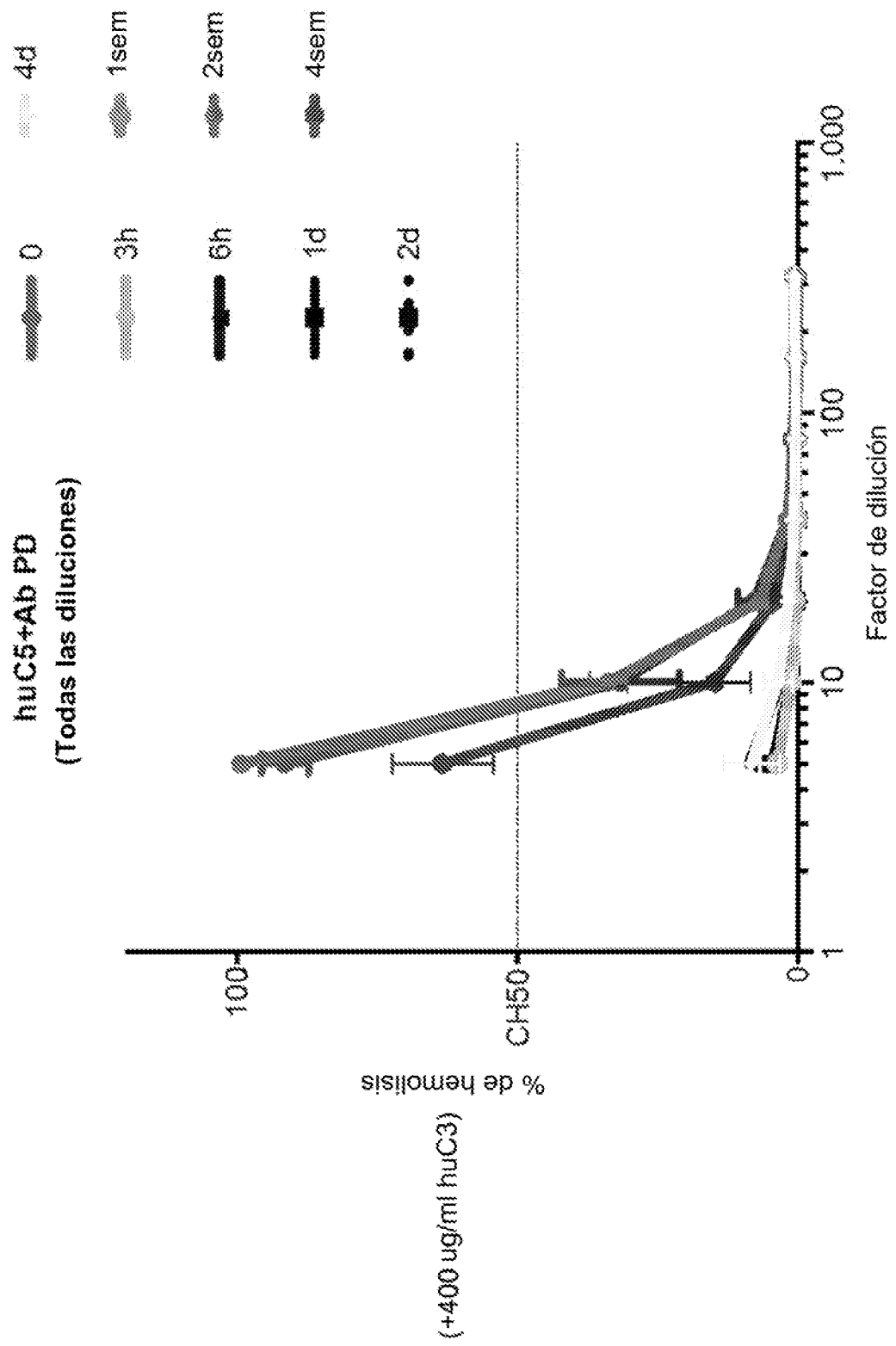


FIGURA 8A (CONT.)

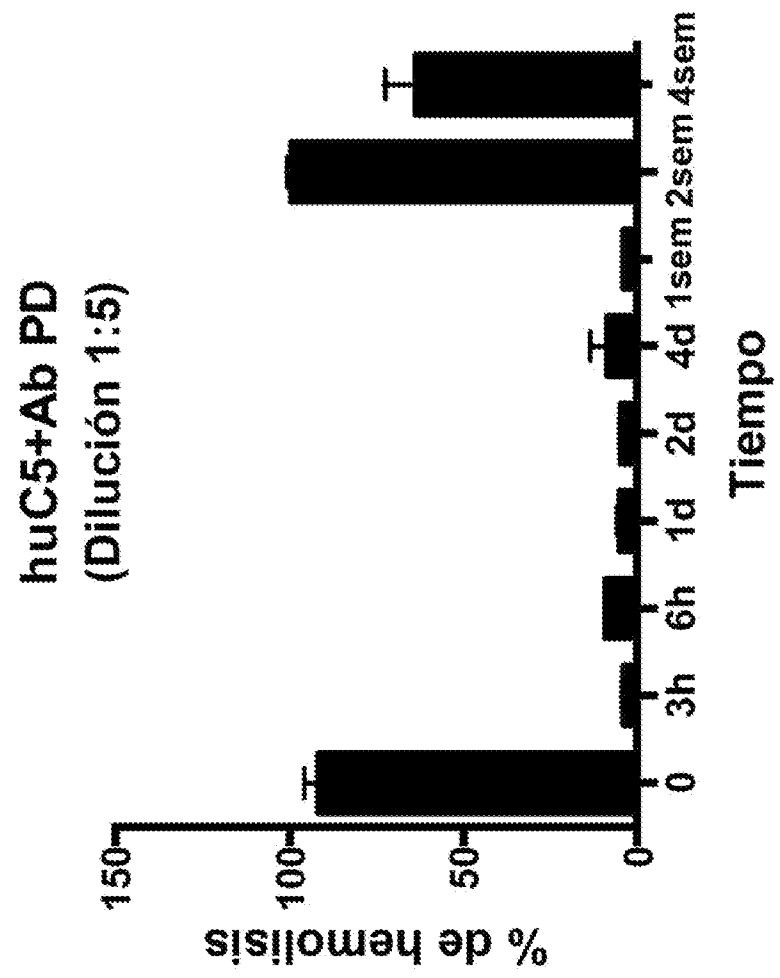


FIGURA 8B

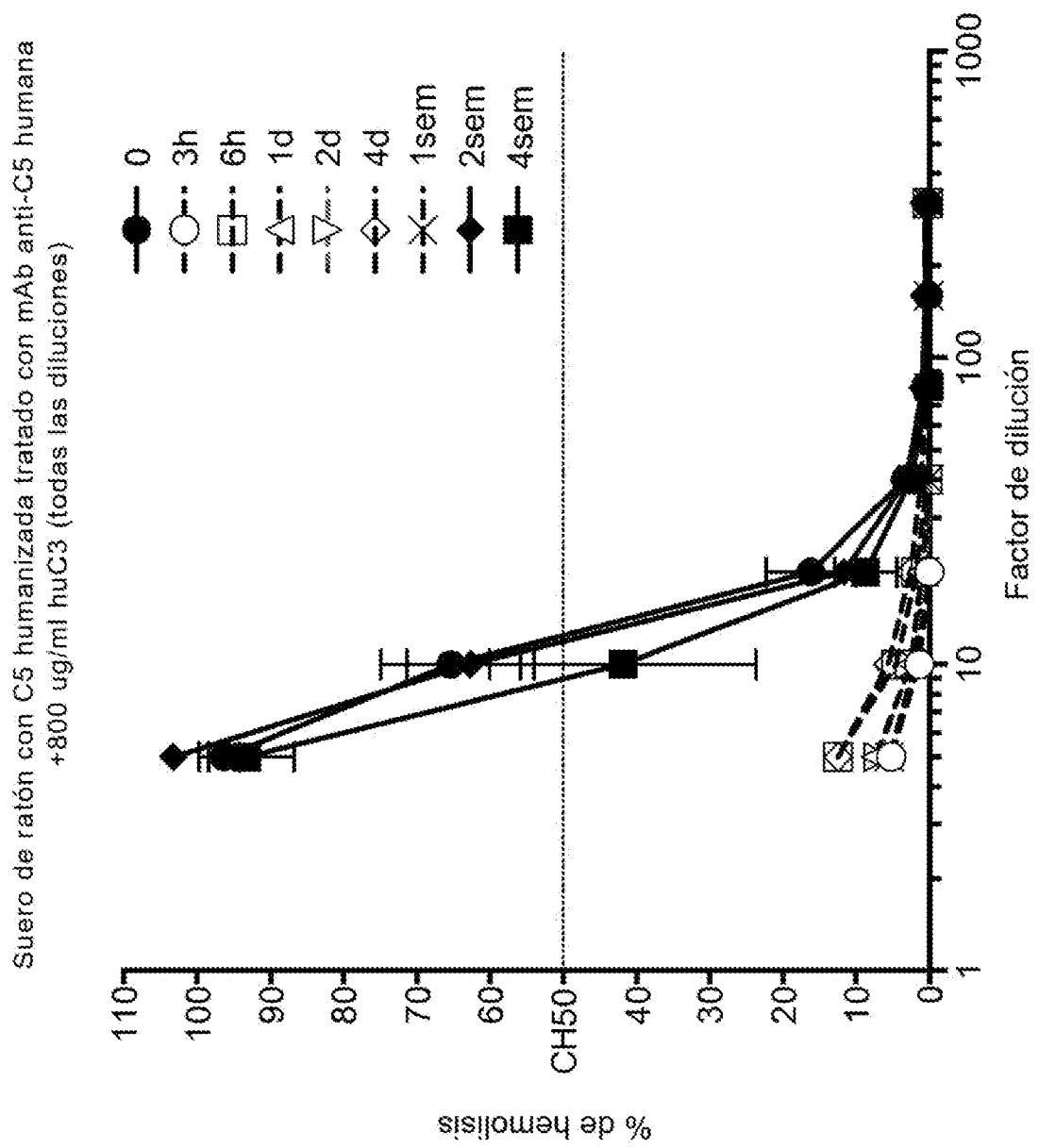


FIGURA 8B (CONT.)

Suero de ratón con C5 humanizada tratado con mAb anti-C5 humana
Dilución 1:5 en diferentes puntos temporales

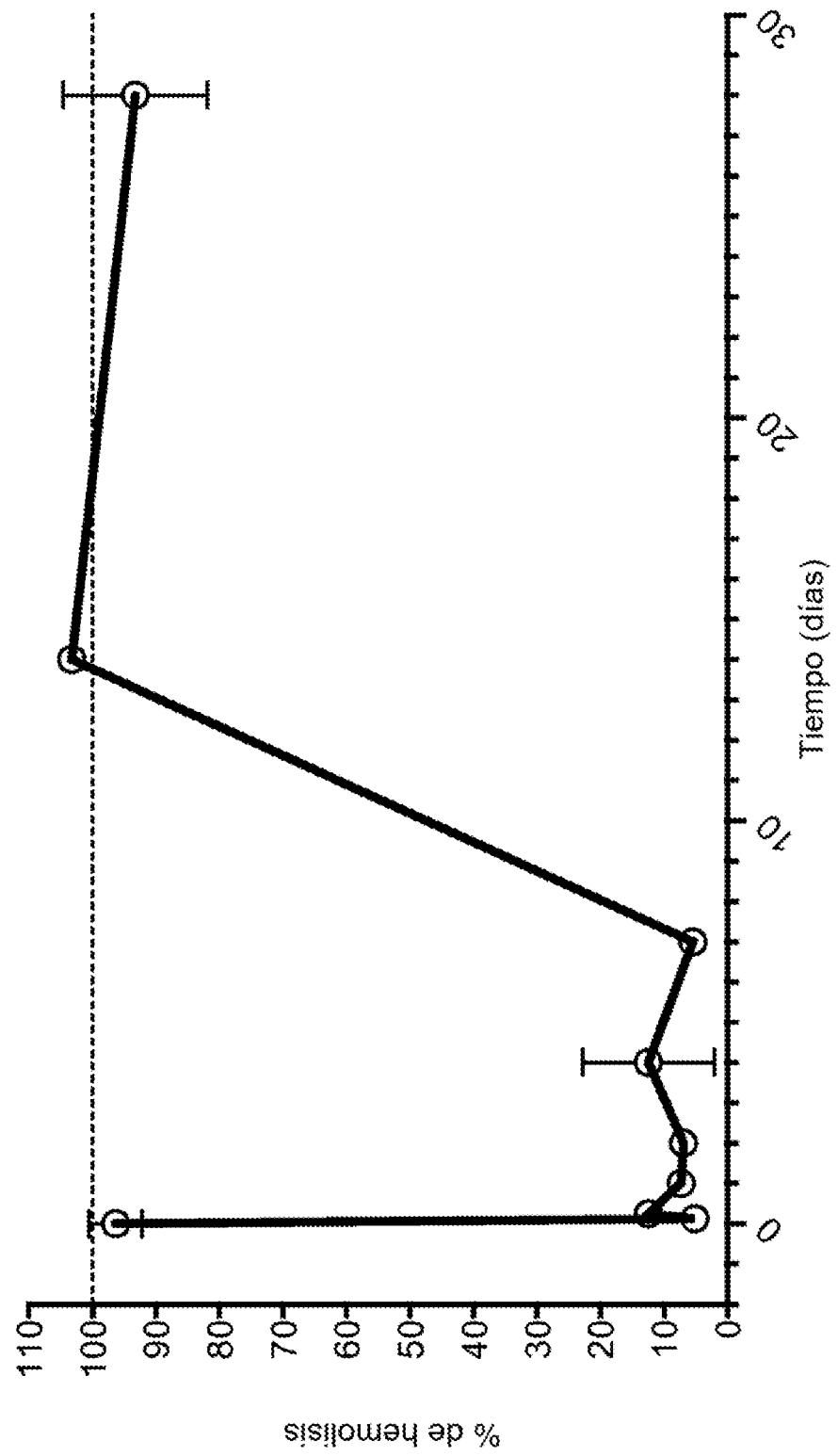


FIGURA 9A

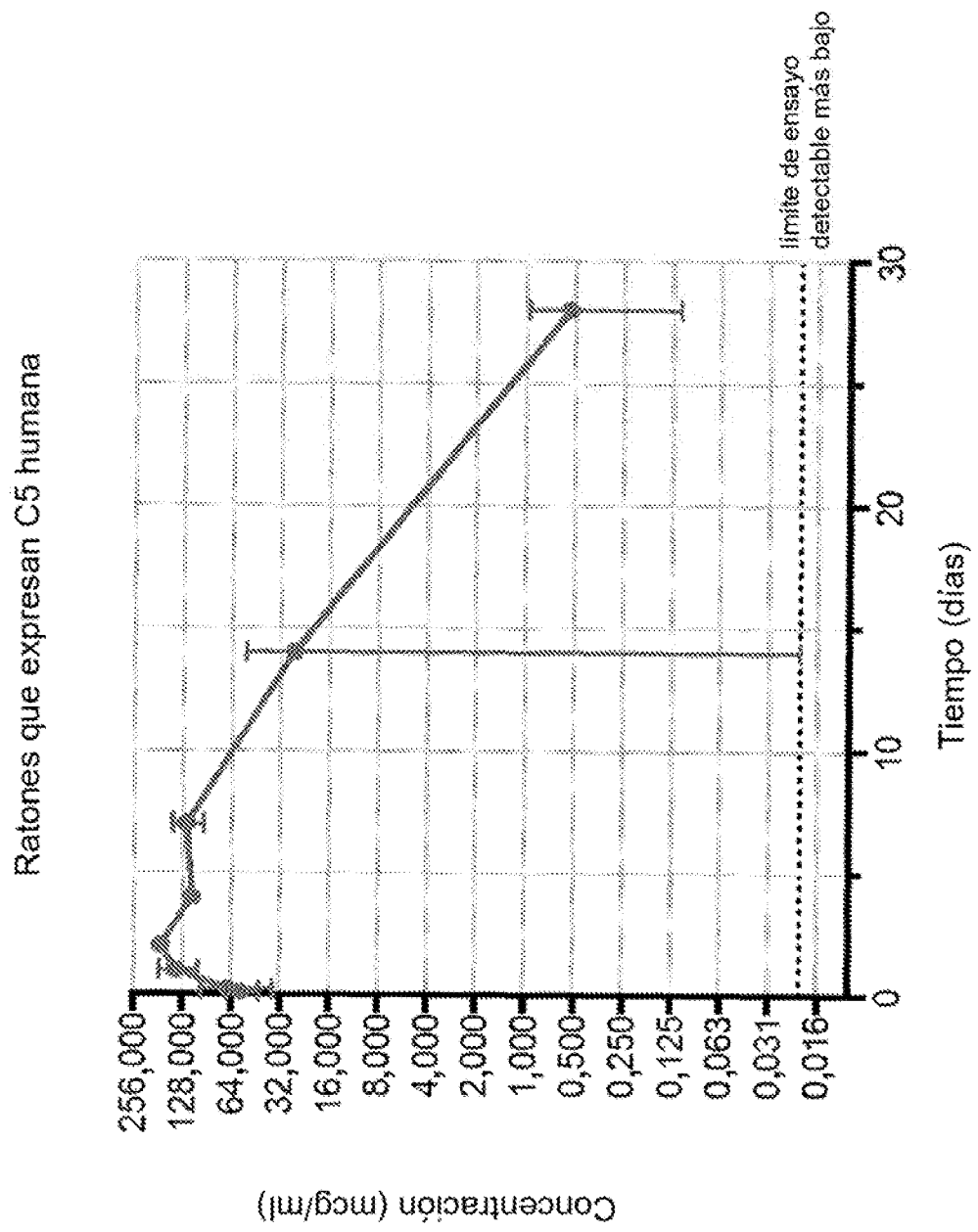


FIGURA 9B

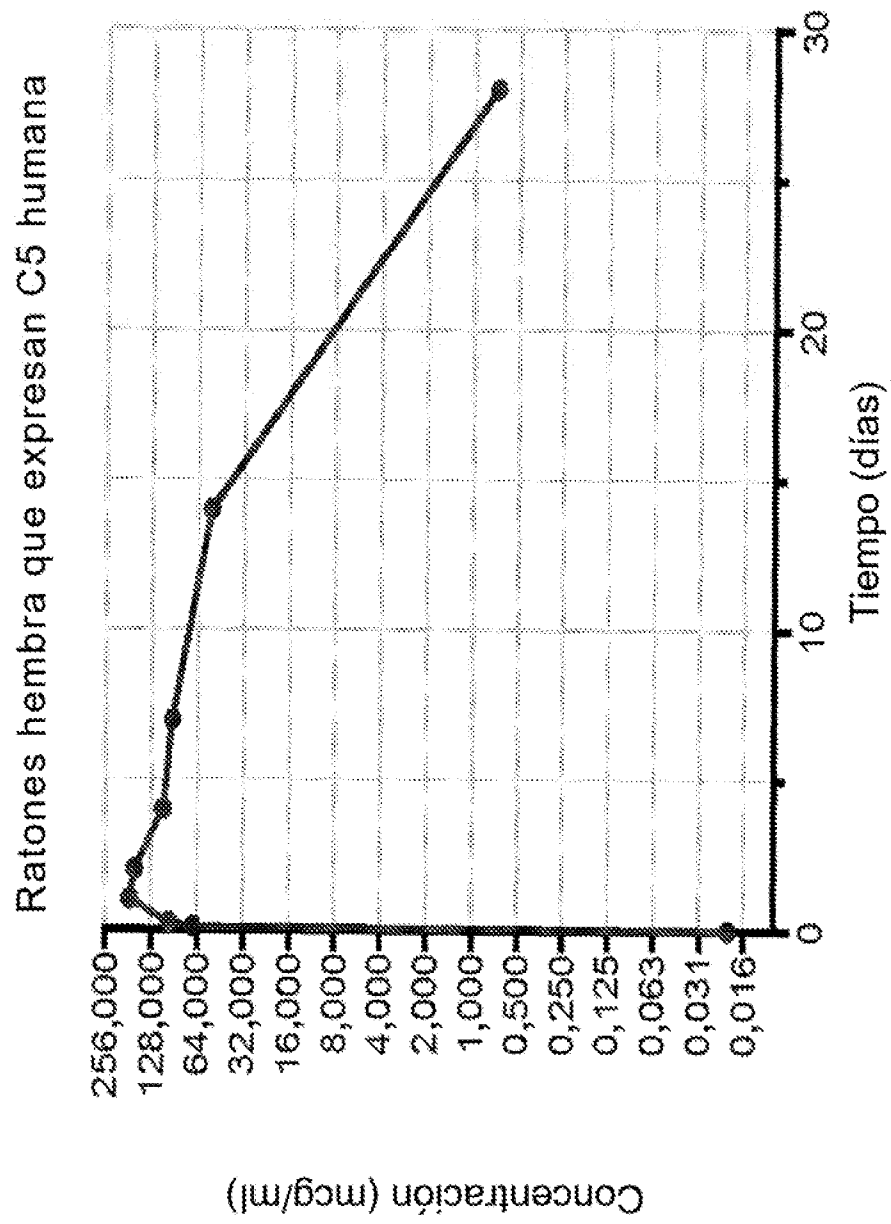


FIGURA 9B (CONT.)

Ratones macho que expresan C5 humana

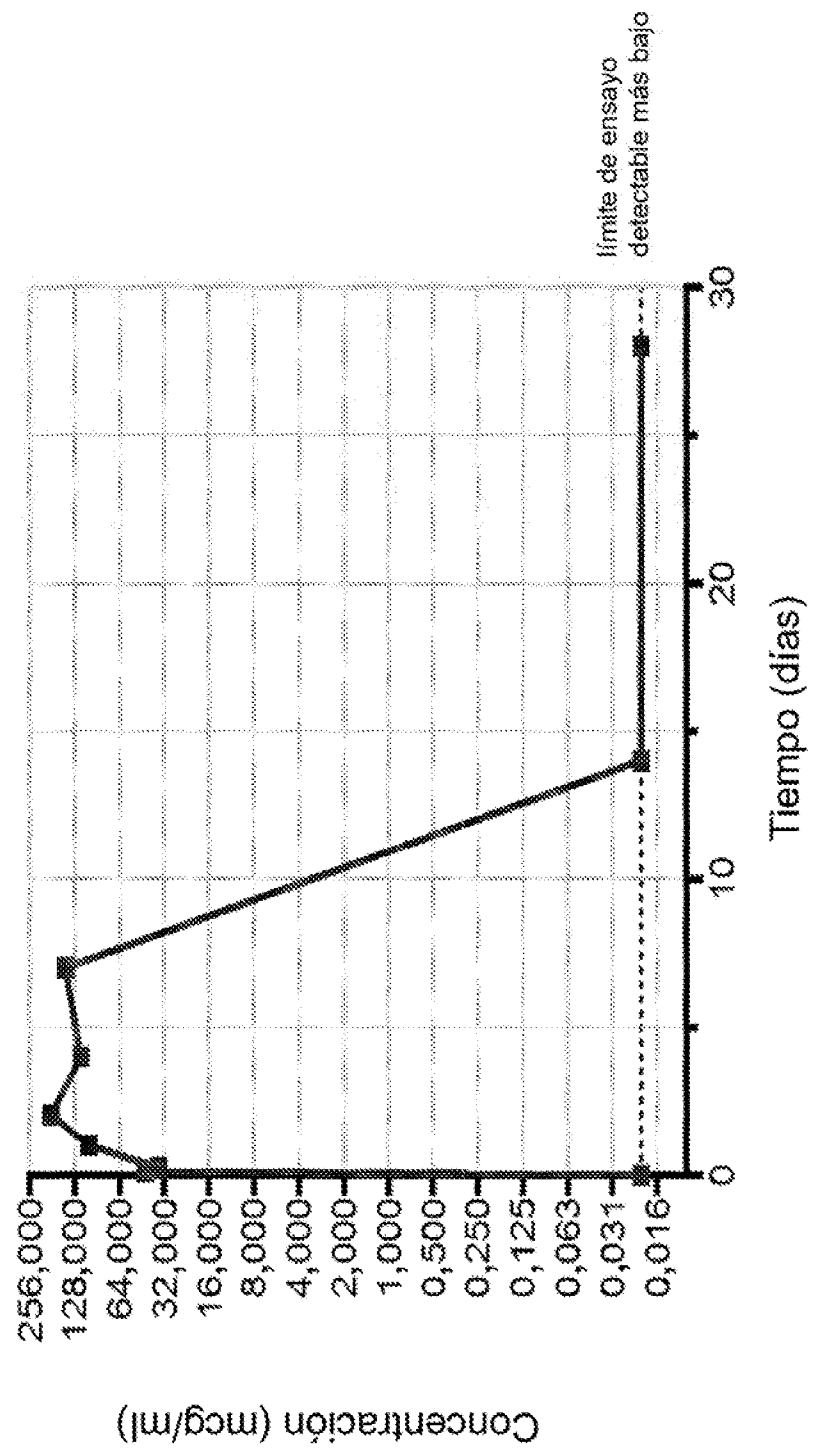
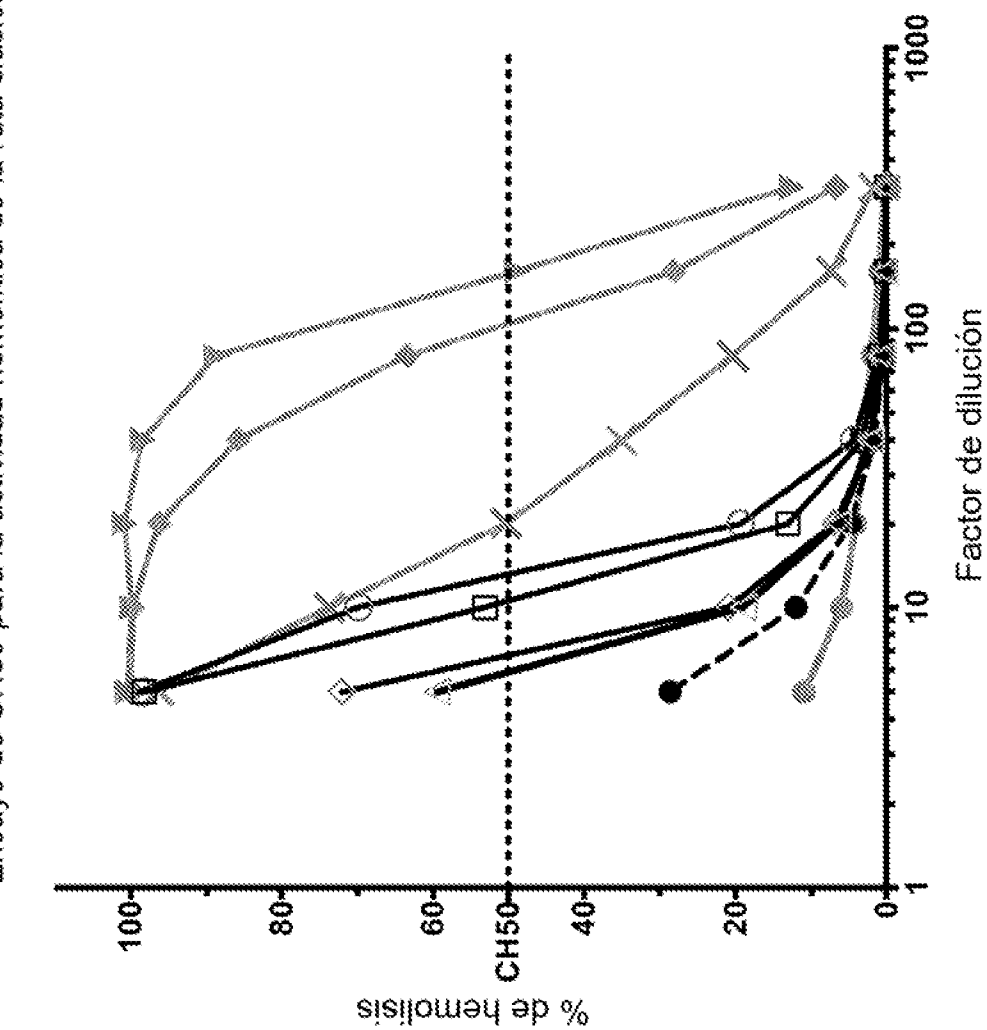


FIGURA 10A

Ensayo de CH50 para la actividad hemolítica de la ruta clásica



- C3empob Hum
- C3empob Hum + 100 ug/ml
- C3empob Hum + 500 ug/ml
- C3empob Hum + 1200 ug/ml
- TS
- TS + C3 50 ug/ml
- TS + C3 100 ug/ml
- TS + C3 500 ug/ml
- TS + C3 1200 ug/ml

	Humana (ug/ml)	Ratón (ug/ml)
C3	1200	150
C5	50	90

FIGURA 10B

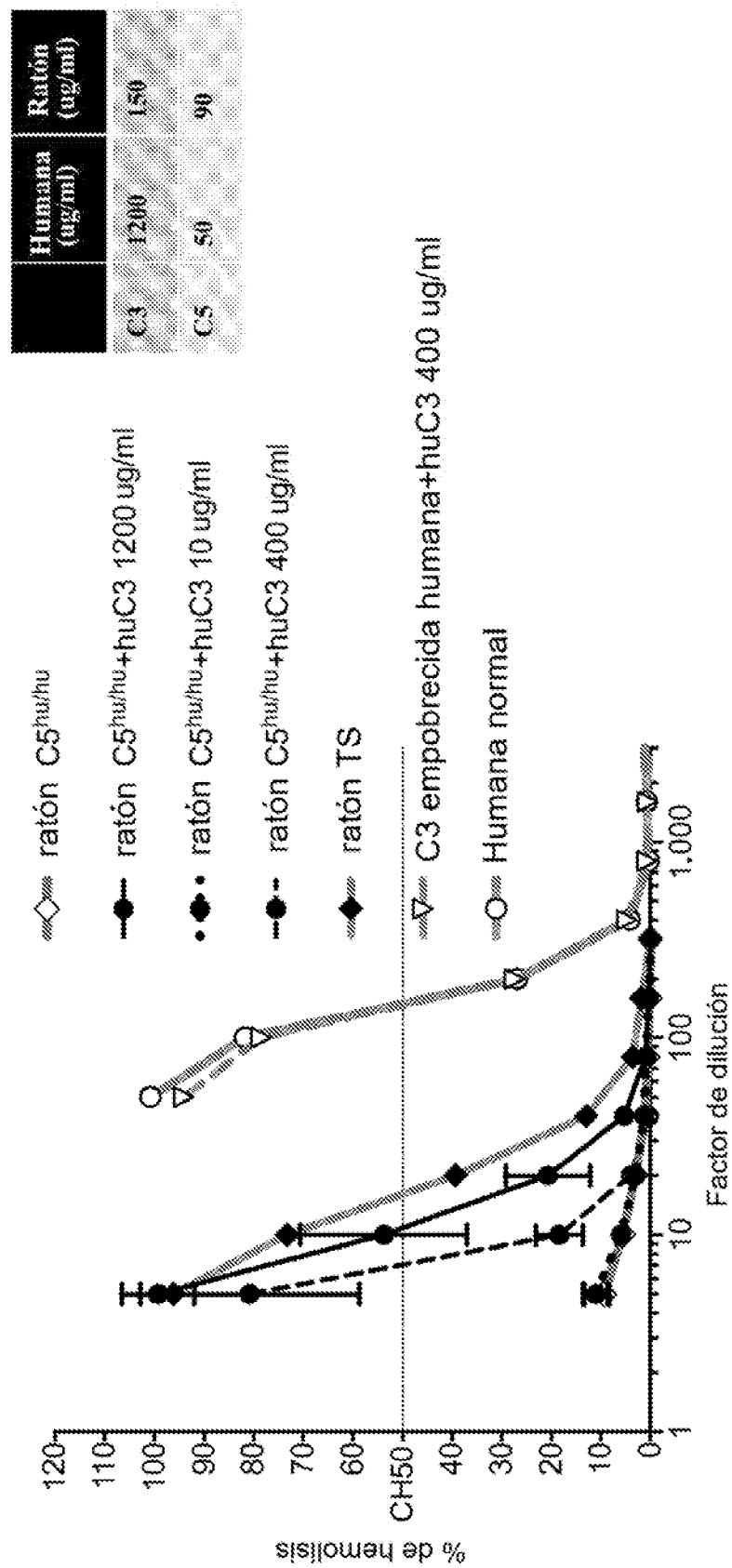
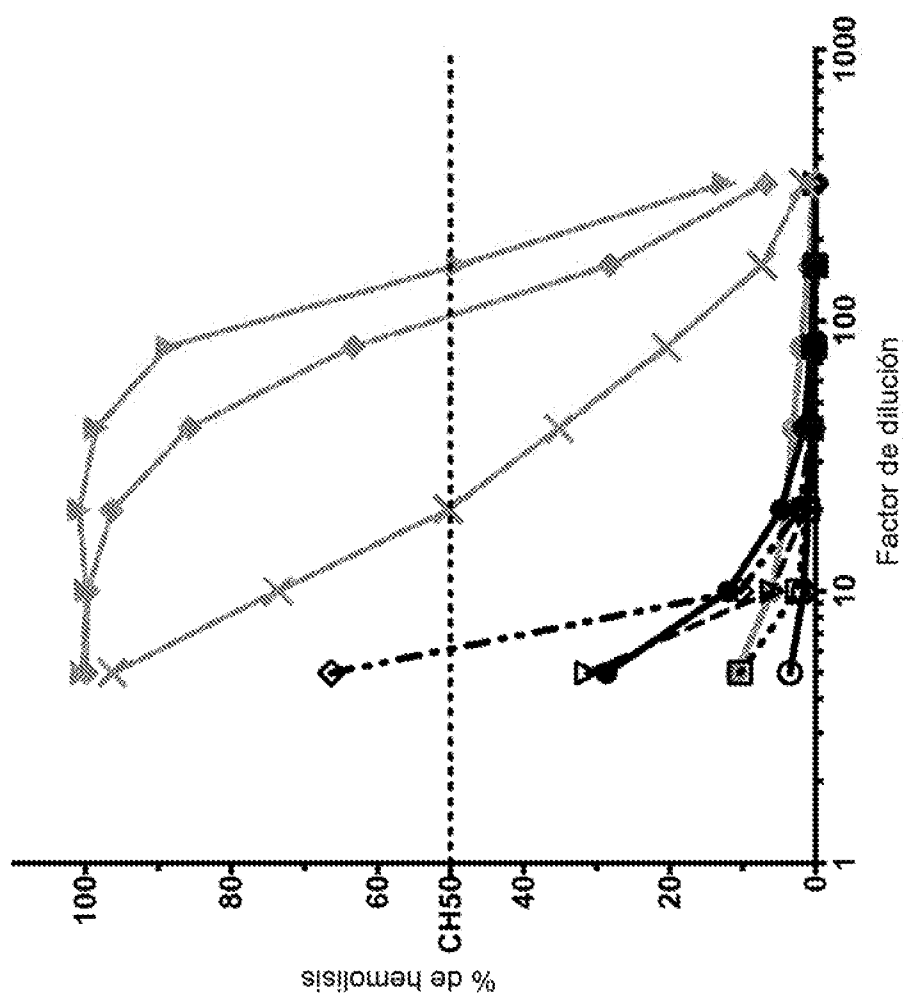


FIGURA 11

Ensayo de CH50 para la actividad hemolítica de la ruta clásica



- C3 KO
- C3KO + C3 100 ug/ml
- ▽— C3KO + C3 500 ug/ml
- ◇— C3KO + C3 1200 ug/ml
- TS
- ◇— C3empob Hum
- ×— C3empob Hum + 100 ug/ml
- ◇— C3empob Hum + 500 ug/ml
- ×— C3empob Hum + 1200 ug/ml

	Humana (ug/ml)	Ratón (ug/ml)
C3	1200	150
C5	50	90

FIGURA 12

