

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 515**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A01K 67/027 (2014.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2015** **E 20194168 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024** **EP 3808775**

54 Título: **Animales no humanos que tienen un gen del grupo de diferenciación 274 humanizado**

30 Prioridad:

09.12.2014 US 201462089549 P

22.01.2015 US 201562106525 P

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

16.10.2024

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

(100.0%)

**777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591-6707, US**

72 Inventor/es:

BUROVA, ELENA;

TANG, YAJUN;

LAI, KA-MAN VENUS y

MURPHY, ANDREW J.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 982 515 T3

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

DESCRIPCIÓN

Animales no humanos que tienen un gen del grupo de diferenciación 274 humanizado

5 Antecedentes

A pesar de los avances significativos en el tratamiento de la autoinmunidad, el cáncer y las enfermedades infecciosas, persisten importantes desafíos en la industria de la salud mundial. Estos importantes desafíos se deben, en parte, a la capacidad de las células para modular la respuesta inmunitaria por medio de polipéptidos en la superficie celular. A través de algunos polipéptidos en la superficie celular, las células y los microorganismos han usurpado las vías de señalización para atenuar los mecanismos de vigilancia del sistema inmunológico del huésped e inhibir las respuestas inmunitarias a ellos, lo que conduce al desarrollo de fenotipos de enfermedades. Aun así, es deficiente el desarrollo de sistemas *in vivo* para determinar de manera óptima el potencial terapéutico de las nuevas terapias dirigidas para la autoinmunidad, el cáncer y las enfermedades infecciosas que están diseñadas para modular las respuestas inmunitarias a tales patologías de enfermedades y determinar los aspectos moleculares de cómo tales células manipulan las respuestas inmunitarias. Tales sistemas *in vivo* proporcionan una fuente para los ensayos de evaluación de la eficacia terapéutica y el desarrollo de agentes candidatos para el tratamiento de la autoinmunidad, el cáncer y las enfermedades infecciosas en el futuro.

20 Resumen

La presente invención abarca el reconocimiento de la conveniencia de modificar genéticamente animales no humanos para permitir la obtención de sistemas *in vivo* mejorados para la identificación y el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos y, en algunas modalidades, regímenes terapéuticos, que puedan usarse para el tratamiento de la autoinmunidad, las enfermedades inflamatorias y el cáncer. La presente invención abarca, además, el reconocimiento de la conveniencia de modificar genéticamente animales no humanos para permitir la obtención de sistemas *in vivo* mejorados para la identificación y el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos y, en algunas modalidades, regímenes terapéuticos, que puedan usarse para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Adicionalmente, la presente invención abarca, además, el reconocimiento de que los animales no humanos que tienen un gen de CD274 humanizado y/o que de cualquier otra manera expresan, contienen o producen un polipéptido PD-L1 humano o humanizado son convenientes, por ejemplo, para su uso en la identificación y el desarrollo de agentes terapéuticos que regulen positivamente la inmunidad antitumoral y/o antimicrobiana. Los roedores de la presente invención proporcionan sistemas *in vivo* mejorados para la identificación y el desarrollo de terapias combinadas que incluyen la acción dirigida a PD-L1 o la acción dirigida indirectamente a una pareja de unión de PD-L1 (por ejemplo, PD-1, B7-1).

La presente invención proporciona un roedor que tiene un genoma que comprende un gen de CD274 que incluye material genético de dos especies diferentes (por ejemplo, un ser humano y un roedor), como se define en las reivindicaciones. El gen de CD274 de un roedor como se describe en la presente descripción codifica un polipéptido PD-L1 que contiene porciones humanas y de roedor, en donde las porciones humanas y de roedor se unen entre sí y forman un polipéptido PD-L1 funcional. La porción de roedor incluye una porción endógena. El gen de CD274 de un roedor como se describe en la presente descripción codifica un polipéptido PD-L1 que contiene un dominio extracelular, en su totalidad o en parte, de un polipéptido PD-L1 humano.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un roedor que expresa un polipéptido PD-L1, cuyo polipéptido PD-L1 comprende una porción humana y una porción endógena. En algunas modalidades, un polipéptido PD-L1 de la presente invención se traduce en una célula del roedor con un péptido señal no humano; en algunas modalidades determinadas, un péptido señal de roedor.

La porción endógena comprende una porción intracelular de un polipéptido PD-L1 endógeno y una porción transmembrana de un polipéptido PD-L1 endógeno. En algunas modalidades, una porción endógena tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idéntica a una secuencia de aminoácidos correspondiente de un polipéptido PD-L1 de ratón que aparece en la Figura 6. En algunas modalidades, una porción endógena tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos correspondiente de un polipéptido PD-L1 de ratón que aparece en la Figura 6. En algunas modalidades, una porción endógena tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de aminoácidos correspondiente de un polipéptido PD-L1 de ratón que aparece en la Figura 6.

En algunas modalidades, una porción humana comprende los aminoácidos 19-238 de un polipéptido PD-L1 humano. En algunas modalidades, una porción humana comprende los aminoácidos 19-277 de un polipéptido PD-L1 humano. En algunas modalidades, una porción humana comprende los aminoácidos 19-131 de un polipéptido PD-L1 humano. En algunas modalidades, una porción humana comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idéntica a una secuencia de aminoácidos correspondiente de un polipéptido PD-L1 humano que aparece en la Figura 6. En algunas modalidades, una porción humana comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos correspondiente de un polipéptido PD-L1 humano que aparece en la Figura 6. En algunas

modalidades, una porción humana comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de aminoácidos correspondiente de un polipéptido PD-L1 humano que aparece en la Figura 6.

En algunas modalidades, un polipéptido PD-L1 de la presente invención está codificado por un gen de CD274 que incluye una secuencia de CD274 endógena de roedor y una secuencia de CD274 humana. En algunas modalidades determinadas, un gen de CD274 comprende los exones 1, 2, 6 y 7 de CD274 endógeno. En algunas modalidades determinadas, un gen de CD274 comprende, además, un exón 5, en su totalidad o en parte, de CD274 endógeno. En algunas modalidades, un gen de CD274 que incluye una secuencia de CD274 endógena no humana y una secuencia de CD274 humana se encuentra en un locus de CD274 endógeno.

En algunos casos, un gen de CD274 descrito en la presente descripción comprende una secuencia que es al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idéntica a la SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:16. En algunas modalidades, un gen de CD274 descrito en la presente descripción comprende una secuencia que es sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:16. En algunas modalidades, un gen de CD274 descrito en la presente descripción comprende una secuencia que es idéntica a la SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:16.

En algunos casos, un gen de CD274 descrito en la presente descripción comprende la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO: 16. En algunos casos, un gen de CD274 descrito en la presente descripción comprende la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 16. En algunos casos, un gen de CD274 descrito en la presente descripción comprende la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 13. En algunos casos, un gen de CD274 descrito en la presente descripción comprende la SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO: 17. En algunos casos, un gen de CD274 descrito en la presente descripción comprende la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO: 17.

El roedor de la presente invención comprende un locus de CD274 humanizado. El locus de CD274 humanizado es un locus de CD274 endógeno de roedor que se ha modificado genéticamente para incluir una secuencia de CD274 humana. El locus de CD274 humanizado comprende uno o más exones de un gen de CD274 de roedor unido operativamente a uno o más exones, en su totalidad o en parte, de un gen *CD274* humano. En algunas modalidades, un locus de CD274 humanizado comprende, además, las regiones 5' y 3' no traducidas (UTR) de CD274 de roedor que flanquean el uno o más exones de un gen *CD274* humano. El locus de CD274 humanizado está bajo el control de un promotor endógeno de roedor.

En algunas modalidades, un locus de CD274 humanizado comprende los exones 1, 2, 6 y 7 de CD274 de roedor unidos operativamente a los exones 3 y 4 de *CD274* humano. En algunas modalidades, un locus de CD274 humanizado comprende los exones 1, 2, 6 y 7 de CD274 de roedor, los exones 3 y 4 de *CD274* humano y comprende, además, un exón 5 de CD274, cuyo exón 5 de CD274 comprende una porción humana y una porción de roedor, y en donde dichos exones de roedor y humanos están unidos operativamente. En algunas modalidades, una porción humana de un exón 5 de CD274 incluye nucleótidos que codifican residuos de aminoácidos que son parte del dominio extracelular de un polipéptido PD-L1 humano. En algunas modalidades, una porción humana de un exón 5 de CD274 incluye nucleótidos que codifican los residuos de aminoácidos 229-238 de un polipéptido PD-L1 humano. En algunas modalidades, una porción humana de un exón 5 de CD274 incluye alrededor de 32 pb de un exón 5 de *CD274* humano. En algunas modalidades, una porción de roedor de un exón 5 de CD274 incluye nucleótidos que codifican una secuencia transmembrana. En algunas modalidades, una porción de roedor de un exón 5 de CD274 incluye alrededor de 69 pb de un exón 5 de CD274 de roedor. En algunas modalidades determinadas, un locus de CD274 humanizado comprende un exón 5 de CD274 que tiene una secuencia expuesta en la SEQ ID NO:12. En algunas modalidades determinadas, un locus de CD274 humanizado comprende un exón 5 de CD274 que codifica los aminoácidos correspondientes a L229-R238 de un polipéptido PD-L1 humano y los aminoácidos correspondientes a T238-Q263 de un polipéptido PD-L1 de roedor.

La presente invención proporciona un roedor que comprende un gen de CD274 que comprende una porción endógena y una porción humana, en donde las porciones endógena y humana están unidas operativamente a un promotor de CD274 de roedor, como se define en las reivindicaciones.

En algunas modalidades, una porción endógena comprende los exones 1, 2, 6 y 7 de CD274 endógeno. En algunas modalidades, una porción endógena comprende, además, el exón 5, en su totalidad o en parte, de CD274 endógeno. En algunas modalidades, los exones de CD274 endógeno 1, 2, 5 en su totalidad o en parte, 6 y 7 del gen de CD274 endógeno son al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idénticos a los exones 1, 2, 5 en su totalidad o en parte, 6 y 7 correspondientes de un gen *Cd274* de ratón que aparece en la Figura 6. En algunas modalidades, los exones de CD274 endógeno 1, 2, 5 en su totalidad o en parte, 6 y 7 del gen de CD274 endógeno son sustancialmente idénticos a los exones 1, 2, 5 en su totalidad o en parte, 6 y 7 correspondientes de un gen *Cd274* de ratón que aparece en la Figura 6. En algunas modalidades, los exones de CD274 endógeno 1, 2, 5 en su totalidad o en parte, 6 y 7 del gen de CD274 endógeno son idénticos a los exones 1, 2, 5 en su totalidad o en parte, 6 y 7 correspondientes de un gen *Cd274* de ratón que aparece en la Figura 6.

En algunas modalidades, una porción humana codifica los aminoácidos 19-131, 19-227 o 19-238 de un polipéptido

PD-L1 humano.

- En algunas modalidades, una porción humana comprende los exones 3 y 4 de un gen *CD274* humano. En algunas modalidades, una porción humana comprende, además, un exón 5, en su totalidad o en parte, de *CD274* humano. En algunas modalidades, los exones 3, 4 y 5, en su totalidad o en parte, de *CD274* humano son al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idénticos a los exones 3, 4 y 5, en su totalidad o en parte, correspondientes de un gen *CD274* humano que aparece en la Figura 6. En algunas modalidades, los exones 3, 4 y 5, en su totalidad o en parte, de *CD274* humano son sustancialmente idénticos a los exones 3, 4 y 5 en su totalidad o en parte, correspondientes de un gen *CD274* humano que aparece en la Figura 6. En algunas modalidades, los exones 3, 4 y 5, en su totalidad o en parte, de un gen de *CD274* son idénticos a los exones 3, 4 y 5, en su totalidad o en parte, correspondientes de un gen *CD274* humano que aparece en la Figura 6. En algunas modalidades, una porción humana comprende una secuencia de codones optimizados para la expresión en un roedor; en algunas modalidades determinadas, la expresión en un ratón o una rata.
- En algunas modalidades, una porción humana incluye una secuencia que es al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, una porción humana incluye una secuencia que es sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, una porción humana incluye una secuencia que es idéntica a la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, una porción humana comprende la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, una porción humana comprende una secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:11. En algunas modalidades, una porción humana comprende la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:11.
- En algunas modalidades, un roedor de la presente invención tiene un genoma que comprende un gen de *CD274* que comprende la SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 17 o una de sus combinaciones.
- En algunas modalidades, la presente invención proporciona un polipéptido PD-L1 producido, expresado o generado por un roedor como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades determinadas, un polipéptido PD-L1 producido, expresado o generado por un roedor como se describe en la presente descripción comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idéntica a un polipéptido PD-L1 humanizado que aparece en la Figura 6. En algunas modalidades determinadas, un polipéptido PD-L1 producido, expresado o generado por un roedor como se describe en la presente descripción comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a un polipéptido PD-L1 humanizado que aparece en la Figura 6. En algunas modalidades determinadas, un polipéptido PD-L1 producido, expresado o generado por un roedor como se describe en la presente descripción comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a un polipéptido PD-L1 humanizado que aparece en la Figura 6.
- En la presente se describe una célula o tejido aislado a partir de un roedor como se describe en la presente descripción. En algunos casos, una célula o tejido aislado comprende un gen de *CD274* como se describe en la presente descripción. En algunos casos, una célula es de un linaje linfóide. En algunos casos, una célula es de un linaje mielóide. En algunos casos, una célula se selecciona de un linfocito B, una célula dendrítica, un macrófago, un monocito y un linfocito T. En algunos casos, un tejido se selecciona de tejido adiposo, vejiga, cerebro, mama, médula ósea, ojo, corazón, intestino, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, músculo, páncreas, plasma, suero, piel, bazo, estómago, timo, testículo, ovario y una de sus combinaciones.
- En la presente descripción se describe una célula madre embrionaria de roedor cuyo genoma comprende un gen de *CD274* como se describe en la presente descripción. En algunos casos determinados, una célula madre embrionaria de roedor es una célula madre embrionaria de ratón y es de una cepa 129, una cepa C57BL o una de sus mezclas. En algunas modalidades determinadas, una célula madre embrionaria de roedor es una célula madre embrionaria de ratón y es una mezcla de las cepas 129 y C57BL.
- Una célula madre embrionaria de roedor descrita en la presente descripción puede tener un genoma que comprende un gen de *CD274* que comprende la SEQ ID NO:13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 o una de sus combinaciones.
- En la presente descripción se describe el uso de una célula madre embrionaria de roedor como se describe en la presente descripción para producir un roedor. En algunas modalidades determinadas, una célula madre embrionaria de roedor es una célula madre embrionaria de ratón y se usa para producir un ratón que comprende un gen de *CD274* como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades determinadas, una célula madre embrionaria de roedor es una célula madre embrionaria de rata y se usa para producir una rata que comprende un gen de *CD274* como se describe en la presente descripción.
- En la presente descripción se describe un embrión de roedor que comprende, se produce, se obtiene, o se genera a partir de una célula madre embrionaria de roedor que comprende un gen de *CD274* como se describe en la presente

descripción. El embrión es un embrión de roedor; en algunas modalidades, un embrión de ratón; en algunas modalidades, un embrión de rata.

5 En la presente descripción se describe el uso de un embrión de roedor como se describe en la presente descripción para producir un roedor. En algunos casos determinados, un embrión de roedor es un embrión de ratón y se usa para producir un ratón que comprende un gen de CD274 como se describe en la presente descripción. En algunos casos determinados, un embrión de roedor es un embrión de rata y se usa para producir una rata que comprende un gen de CD274 como se describe en la presente descripción.

10 La presente invención también proporciona un vector o constructo de ácido nucleico de transformación como se expone en las reivindicaciones. El vector o constructo de ácido nucleico de transformación comprende un gen de CD274 humanizado como se describe en la presente descripción. El vector (o constructo de ácido nucleico) de transformación comprende un gen de CD274 que codifica un polipéptido PD-L1 que comprende un dominio extracelular humano en su totalidad o en parte; en algunas modalidades determinadas un polipéptido PD-L1 que
15 comprende los aminoácidos 19-131, 19-227 o 19-238 de un polipéptido PD-L1 humano.

Un vector o constructo de ácido nucleico de transformación de la presente invención comprende uno o más exones, en su totalidad o en parte, de un gen de CD274 de roedor unidos operativamente a uno o más exones, en su totalidad o en parte, de un gen *CD274* humano. En algunas modalidades, un vector o constructo de ácido nucleico de
20 transformación comprende las regiones 5' y 3' no traducidas (UTR) de CD274 de roedor que flanquean el uno o más exones de un gen *CD274* humano. En algunas modalidades, un vector o constructo de ácido nucleico de transformación comprende uno o más marcadores de selección. En algunas modalidades, un vector o constructo de ácido nucleico de transformación comprende uno o más sitios de recombinación sitio específica. En algunas modalidades, un vector o constructo de ácido nucleico de transformación comprende los exones 3 y 4 de *CD274*
25 humano. En algunas modalidades, un vector o constructo de ácido nucleico de transformación comprende los exones 3 y 4 de *CD274* humano y un exón 5, en su totalidad o en parte, de *CD274* humano.

En algunas modalidades, un vector o constructo de ácido nucleico de transformación comprende la SEQ ID NO:7. En algunas modalidades determinadas, un vector o constructo de ácido nucleico de transformación comprende una
30 secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a cualquiera de la SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11.

En la presente descripción se describe el uso de un vector o constructo de ácido nucleico de transformación como se describe en la presente descripción para producir una célula madre embrionaria de roedor modificada. En la presente descripción se describe el uso de un vector o constructo de ácido nucleico de transformación como se describe en la
35 presente descripción para producir un embrión de roedor modificado. En la presente descripción se describe el uso de un vector o constructo de ácido nucleico de transformación como se describe en la presente descripción para producir un embrión de roedor modificado. En la presente descripción se describe el uso de un vector o constructo de ácido nucleico de transformación como se describe en la presente descripción para producir un roedor.

40 En la presente descripción se describe un método para producir un roedor que expresa un polipéptido PD-L1 a partir de un gen de CD274 endógeno, en donde el polipéptido PD-L1 comprende una secuencia humana, el método comprende (a) insertar un fragmento genómico en un gen de CD274 endógeno en una célula madre embrionaria de roedor, dicho fragmento genómico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido PD-L1 humano en su totalidad o en parte; (b) obtener la célula madre embrionaria de roedor generada en (a); y, (c) crear un
45 roedor mediante el uso de la célula madre embrionaria de roedor de (b).

En algunos casos, una secuencia humana comprende los aminoácidos 19-131, 19-227 o 19-238 de un polipéptido PD-L1 humano.

50 En algunos casos, una secuencia de nucleótidos comprende los exones 3 y 4 de *CD274* humano. En algunos casos, una secuencia de nucleótidos comprende, además, el exón 5, en su totalidad o en parte, de *CD274* humano. En algunos casos, una secuencia de nucleótidos comprende uno o más marcadores de selección. En algunos casos, una secuencia de nucleótidos comprende uno o más sitios de recombinación sitio específica.

55 En la presente descripción se describe un método para producir un roedor cuyo genoma comprende un gen de CD274 que codifica un polipéptido PD-L1 que tiene una porción humana y una porción endógena, cuyas porciones están unidas operativamente a un promotor de CD274 endógeno de roedor, el método comprende modificar el genoma de un roedor de manera que este comprenda un gen de CD274 que codifica un polipéptido PD-L1 que tiene una porción humana y una porción endógena, cuyas porciones están unidas operativamente a un promotor de CD274 endógeno
60 de roedor, para producir así dicho roedor. El promotor de CD274 es un promotor de CD274 endógeno de roedor.

En algunos casos, una porción humana comprende los aminoácidos 19-131, 19-227 o 19-238 de un polipéptido PD-L1 humano.

65 En algunos casos, un gen de CD274 se modifica para incluir los exones 3 y 4 de *CD274* humano. En algunas modalidades, un gen de CD274 se modifica para incluir los exones 3, 4 y 5, en su totalidad o en parte, de *CD274*

humano.

En algunos casos, la modificación del genoma de un roedor se realiza en una célula madre embrionaria de roedor seguido de la generación de un animal roedor con dicha célula madre embrionaria de roedor.

La célula madre embrionaria es una célula madre embrionaria de roedor; en algunos casos, una célula madre embrionaria de ratón; en algunos casos, una célula madre embrionaria de rata.

En la presente descripción también se describe un roedor que puede obtenerse, generarse o producirse por un método como se describe en la presente descripción.

En la presente descripción se describe un método para reducir, prevenir o eliminar el crecimiento tumoral en un roedor, el método comprende las etapas de administrar un fármaco dirigido a PD-L1 humano a un roedor cuyo genoma comprende un gen de CD274 que codifica un polipéptido PD-L1 que tiene una porción humana y una porción endógena, cuyas porciones están unidas operativamente a un promotor de CD274 de roedor; la administración se realiza en condiciones y durante un tiempo suficiente para reducir, prevenir o eliminar el crecimiento tumoral en el roedor.

En la presente descripción se describe un método para provocar la muerte de células tumorales en un roedor, el método comprende las etapas de administrar un fármaco dirigido a PD-L1 humano a un roedor cuyo genoma comprende un gen de CD274 que codifica un polipéptido PD-L1 que tiene una porción humana y una porción endógena, cuyas porciones están unidas operativamente a un promotor de CD274 de roedor; la administración se realiza en condiciones y durante un tiempo suficiente para que el fármaco medie la muerte de las células tumorales en el roedor.

La presente invención proporciona un método para evaluar las propiedades farmacocinéticas de un fármaco dirigido a PD-L1 humano, como se define en las reivindicaciones. El método comprende las etapas de administrar un fármaco dirigido a PD-L1 humano a un roedor cuyo genoma comprende un gen de CD274 que codifica un polipéptido PD-L1 que tiene una porción humana y una porción endógena, cuyas porciones están unidas operativamente a un promotor de CD274 de animal roedor; y realizar un ensayo para determinar una o más propiedades farmacocinéticas del fármaco dirigido a PD-L1 humano.

En la presente descripción se describe un método para evaluar la eficacia de un fármaco dirigido a PD-L1 humano, el método comprende las etapas de administrar un fármaco dirigido a PD-L1 humano a un roedor cuyo genoma comprende un gen de CD274 que codifica un polipéptido PD-L1 que tiene una porción humana y una porción endógena, cuyas porciones están unidas operativamente a un promotor de CD274 de roedor; y realizar un ensayo para determinar la eficacia del fármaco dirigido a PD-L1 humano.

Un roedor como se describe en la presente descripción es un roedor cuyo genoma incluye un gen de CD274 que codifica un polipéptido PD-L1 que tiene una porción humana y una porción endógena, cuyas porciones están unidas operativamente a un promotor de CD274 endógeno de roedor. En varias modalidades, una porción humana comprende los aminoácidos 19-131, 19-227 o 19-238 de un polipéptido PD-L1 humano.

En algunos casos, un fármaco dirigido a PD-L1 humano puede ser un antagonista de PD-L1. En algunos casos, un fármaco dirigido a PD-L1 humano puede ser un agonista de PD-L1. En algunos casos, un fármaco dirigido a PD-L1 humano puede ser un anticuerpo anti-PD-L1. En algunos casos, un fármaco dirigido a PD-L1 humano se puede administrar a un animal no humano por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea.

En la presente descripción se describe un método para la identificación o validación de un fármaco o vacuna, el método comprende las etapas de suministrar un fármaco o vacuna a un roedor cuyo genoma incluye un gen de CD274 como se describe en la presente descripción y monitorizar uno o más de la respuesta inmunitaria al fármaco o vacuna, el perfil de seguridad del fármaco o vacuna, o el efecto sobre una enfermedad, trastorno o afección. En algunos casos, la monitorización del perfil de seguridad incluye determinar si el roedor exhibe un efecto secundario o una reacción adversa como resultado del suministro del fármaco o vacuna. En algunos casos, un efecto secundario o una reacción adversa se selecciona de morbilidad, mortalidad, alteración del peso corporal, alteración del nivel de una o más enzimas (por ejemplo, hepáticas), alteración en el peso de uno o más órganos, pérdida de función (por ejemplo, sensorial, motora, de órganos, etcétera), aumento de la susceptibilidad a una o más enfermedades, alteraciones al genoma del roedor, aumento o disminución del consumo de alimentos y complicaciones de una o más enfermedades. En algunos casos, la enfermedad, trastorno o afección se induce en el roedor. En algunos casos, la enfermedad, trastorno o afección inducida en el roedor se asocia con una enfermedad, trastorno o afección que padecen uno o más pacientes humanos que necesitan tratamiento. En algunos casos determinados, el fármaco es un anticuerpo.

En la presente descripción se describe el uso de un roedor como se describe en la presente descripción en el desarrollo de un fármaco o vacuna para su uso en medicina, tal como el uso como un medicamento.

En la presente descripción se describe el uso de un roedor como se describe en la presente descripción en la

fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer o una neoplasia.

En la presente descripción se describe el uso de un roedor como se describe en la presente descripción en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad infecciosa.

En la presente descripción se describe el uso de un roedor como se describe en la presente descripción en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria.

En la presente descripción se describe el uso de un roedor como se describe en la presente descripción en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria.

Un gen de CD274 descrito en la presente descripción codifica un polipéptido PD-L1 que tiene una porción humana y una porción endógena, cuyas porciones están unidas operativamente a un promotor endógeno de roedor. En varios casos, una porción humana comprende los exones 3 y 4 de *CD274* humano. En varios casos, una porción humana comprende los exones 3 y 4 de *CD274* humano y un exón 5, en su totalidad o en parte, de *CD274* humano,

En varios casos, un polipéptido PD-L1 de la presente invención incluye un polipéptido PD-L1 como se describe en la presente descripción.

En varias modalidades, un roedor de la presente invención no expresa de manera detectable un polipéptido PD-L1 endógeno de roedor de longitud completa. En varias modalidades, un roedor de la presente invención no expresa de manera detectable una porción extracelular de un polipéptido PD-L1 endógeno. En varias modalidades, un roedor de la presente invención no expresa de manera detectable un dominio V de inmunoglobulina y, en algunas modalidades, un dominio C de inmunoglobulina de un polipéptido PD-L1 endógeno.

El animal de la presente invención es un roedor; en algunas modalidades, un ratón; en algunas modalidades, una rata.

Como se usa en esta solicitud, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" se usan como equivalentes. Cualquier número usado en esta solicitud con o sin alrededor de/aproximadamente pretende abarcar cualquiera de las fluctuaciones normales apreciadas por un experto en la técnica en cuestión.

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

Breve descripción de los dibujos

El Dibujo que se incluye en la presente descripción, que se compone de las siguientes Figuras, es solamente con propósitos de ilustración y no de limitación.

La Figura 1 muestra un diagrama, que no está a escala, de la organización genómica de los genes del grupo de diferenciación 274 (*CD274*) no humano (por ejemplo, de ratón) y humano. Los exones se numeran debajo de cada exón. Las regiones no traducidas (UTR) se indican con rectángulos sin relleno.

La Figura 2 muestra una ilustración, que no está a escala, de constructos ilustrativos usados en la humanización de un gen del grupo de diferenciación 274 (*CD274*) no humano. El diagrama superior representa un vector de transformación humanizado con un casete de neomicina, mientras que el diagrama inferior representa un vector de transformación humanizado con el casete eliminado. Los sitios de unión de nucleótidos seleccionados se encuentran marcados con una línea debajo de cada unión acompañada por las SEQ ID NO correspondientes. Los fragmentos de humanización ilustrativos se exponen en la Figura 6 y se ilustran de la siguiente manera: fragmento de humanización A: 4494 pb humanos-casete de neomicina-3950 pb humanos (SEQ ID NO:7); fragmento de humanización B: 4494 pb humanos-oxP-3950 pb humanos (SEQ ID NO:8); fragmento de humanización C: fragmento humano de 4494 pb (SEQ ID NO:9); fragmento de humanización D: fragmento humano de 3950 pb (SEQ ID NO: 10).

La Figura 3 muestra un diagrama, que no está a escala, de la organización genómica de los genes del grupo de diferenciación 274 (*CD274*) no humano (por ejemplo, de ratón) y humano que indica los sitios aproximados de las sondas usadas en un ensayo descrito en el Ejemplo 1. También se ilustra un fragmento de humanización ilustrativo (fragmento de humanización E; SEQ ID NO:11) dentro de un gen *CD274* humano y una delección ilustrativa de una porción de un gen *Cd274* de ratón.

La Figura 4 muestra curvas de crecimiento tumoral de MC38.ova/hPD-L1 ilustrativas durante 21 días en ratones homocigotos para la humanización de un gen de PD-L1 endógeno como se describe en el Ejemplo 1. Ab de control: anticuerpo que no es específico para PD-L1, a-hPD-L1: anticuerpo específico para PD-L1 humano. Las flechas indican los días de tratamiento con el anticuerpo durante el experimento. El número de ratones libres de tumor en el día 21 se muestra para cada grupo de tratamiento.

La Figura 5 muestra un análisis de PCR en tiempo real ilustrativo de la expresión del ARNm de CD8b, CD3 y PD-

L1 en esplenocitos de ratones homocigotos para un gen de CD274 endógeno como se describe en el Ejemplo 1 después del tratamiento con anticuerpos anti-PD-L1 o de control. A, media de seis ratones por grupo. B, niveles de expresión para ratones individuales en cada grupo de tratamiento. Ab de control: anticuerpo que no es específico para PD-L1; a-PD-L1: anticuerpo anti-PD-L1.

La Figura 6 muestra secuencias ilustrativas de CD274 y PD-L1 de ratón, humanas y humanizadas, así como secuencias de ácidos nucleicos humanas ilustrativas para la humanización de un gen de CD274 no humano. Para las secuencias de ARNm, la letra en negrita indica la secuencia codificante y los exones consecutivos, cuando se indican, se encuentran separados por texto subrayado alterno; para las secuencias de ARNm humanizadas, las secuencias humanas se encuentran dentro de paréntesis. Para las secuencias de proteínas, los péptidos señal se encuentran subrayados, las secuencias extracelulares con letra en negrita, las secuencias de dominio V de inmunoglobulina (IgV) se encuentran dentro de paréntesis, y las secuencias intracelulares en cursiva; para las secuencias de proteínas humanizadas, las secuencias no humanas se indican en letra normal y las secuencias humanas se indican en letra en negrita. Fragmento de humanización A: 4494 pb humanos-casete de neomicina-3950 pb humanos (SEQ ID NO:7); fragmento de humanización B: 4494 pb humanos-*loxP*-3950 pb humanos (SEQ ID NO:8); fragmento de humanización C: fragmento humano de 4494 pb (SEQ ID NO:9); fragmento de humanización D: fragmento humano de 3950 pb (SEQ ID NO:10).

Definiciones

Esta invención no se limita a los métodos y condiciones experimentales particulares descritos en la presente descripción, ya que estos métodos y condiciones pueden variar. Además, debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción es solamente para el propósito de describir modalidades particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones.

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos y frases usados en la presente descripción incluyen los significados que se atribuyen a los términos y frases en la técnica, a menos que se indique claramente lo contrario o resulte claramente evidente a partir del contexto en el cual se usa el término o frase. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción puede usarse en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación, se describirán métodos y materiales particulares.

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

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

La frase "*proteína de grupo de diferenciación 274*", "*proteína CD274*", "*proteína B7-H1*" o "*proteína PD-L1*" como se usa en la presente descripción, incluye una proteína transmembrana que pertenece a la familia B7 de ligandos de proteínas de la superficie celular y tiene dominios extracelulares V de inmunoglobulina (IgV) y de tipo constante de inmunoglobulina (IgC), que están relacionados con dominios variables y constantes de inmunoglobulina, y dominios transmembrana y citoplasmático (o intracelular). PD-L1 se expresa tanto en linajes linfoides (por ejemplo, células B, células T, células dendríticas, macrófagos, monocitos, etcétera) como en linajes no linfoides (corazón, pulmón, hígado, páncreas, etcétera) y está involucrado en interacciones entre proteínas de superficie de membrana tales como, por ejemplo, muerte celular programada 1 (PD-1) para regular la función inmunitaria. La expresión de PD-L1 está regulada por citocinas (por ejemplo, interferón- γ) y se ha informado que está regulada positivamente en muchos cánceres humanos, lo que puede permitir que dichos cánceres eludan la vigilancia del sistema inmunológico. Se ha demostrado que PD-L1 está involucrado en varios procesos celulares tales como, por ejemplo, infección intracelular, tolerancia periférica, señalización del receptor de células T y proliferación de células T. Se han identificado isoformas de CD274 de corte y empalme alternativo entre el ratón y el hombre. A modo de ilustración, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los genes de CD274 murino y humano se proporcionan en la Figura 6. Después de leer esta descripción los expertos reconocerán que uno o más genes de CD274 endógenos en un genoma (o todos) pueden reemplazarse, modificarse, alterarse, eliminarse, interrumpirse, etcétera, con uno o más genes de CD274 heterólogos (por ejemplo, variantes polimórficas, subtipos o mutantes, genes de otras especies, formas humanizadas, etcétera).

Una "*célula que expresa CD274*", "*célula que expresa B7-H1*" o "*célula que expresa PD-L1*" como se usa en la presente descripción, incluye una célula que expresa un polipéptido transmembrana PD-L1. En algunas modalidades, una célula que expresa PD-L1 expresa polipéptidos transmembrana PD-L1 en su superficie. En algunas modalidades, los polipéptidos PD-L1 se expresan en la superficie de la célula en una cantidad suficiente para mediar las interacciones

entre células (por ejemplo, a través de interacciones con polipéptidos del receptor PD-1). Las células que expresan PD-L1 ilustrativas incluyen células B, células dendríticas, macrófagos, monocitos y células T. Las células que expresan PD-L1 modulan la activación o inhibición de las células linfoides para aumentar o atenuar las respuestas inmunitarias. En algunas modalidades, los roedores de la presente invención demuestran la regulación de varios procesos celulares (como se describe en la presente descripción) por medio de polipéptidos PD-L1 humanizados expresados en la superficie de una o más células del animal no humano.

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

El término "*conservadora*", como se usa en la presente descripción para describir una sustitución de aminoácido conservadora, incluye la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de un receptor de unirse a un ligando. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen: cadenas laterales alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; cadenas laterales hidroxialifáticas tales como serina y treonina; cadenas laterales que contienen amida tales como asparagina y glutamina; cadenas laterales aromáticas tales como fenilalanina, tirosina, y triptófano; cadenas laterales básicas tales como lisina, arginina, e histidina; cadenas laterales ácidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y, cadenas laterales que contienen azufre tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/tirosina, lisina/arginina, alanina/valina, glutamato/aspartato, y asparagina/glutamina. En algunas modalidades, una sustitución de aminoácido conservadora puede ser una sustitución de cualquier residuo nativo en una proteína con alanina, como se usa en, por ejemplo, la mutagénesis por barrido de alanina. En algunas modalidades, se produce una sustitución conservadora que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 G. H. descrita en Gonnet y otros, 1992, Science 256:1443-1445. En algunas modalidades, una sustitución es una sustitución moderadamente conservadora en donde la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

El término "*control*", como se usa en la presente descripción, incluye el significado que se entiende en la técnica de un "*control*" que es un estándar contra el cual se comparan los resultados. Típicamente, los controles se usan para aumentar la integridad en los experimentos mediante el aislamiento de variables para llegar a una conclusión sobre tales variables. En algunas modalidades, un control es una reacción o un ensayo que se realiza de manera simultánea con una reacción o un ensayo de prueba para proporcionar un comparador. Como se usa en la presente descripción, un "*control*" puede referirse a un "*animal de control*". Un "*animal de control*" puede tener una modificación como se describe en la presente descripción, una modificación que es diferente a como se describe en la presente descripción, o puede no tener modificaciones (es decir, es un animal de tipo silvestre). En un experimento, se aplica una "*prueba*" (es decir, una variable que se evalúa). En un segundo experimento, el "*control*", no se aplica la variable que se evalúa, en algunas modalidades, un control es un control histórico (es decir, de una prueba o un ensayo realizados previamente, o una cantidad o resultado que se conoce previamente). En algunas modalidades, un control es o comprende un registro impreso o guardado de cualquier otra manera. Un control puede ser un control positivo o un control negativo.

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

Los términos "*determinar*", "*medir*", "*evaluar*", "*valorar*", "*ensayar*" y "*analizar*" se usan indistintamente en la presente descripción para referirse a cualquier forma de medición, e incluyen determinar si un elemento está presente o no. Estos términos incluyen determinaciones cuantitativas y/o cualitativas. El ensayo puede ser relativo o absoluto. "Ensayo para determinar la presencia de puede ser determinar la cantidad de algo presente y/o determinar si está presente o ausente.

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

La frase "*promotor endógeno*" incluye un promotor que se asocia naturalmente, por ejemplo, en un organismo de tipo silvestre, con un gen endógeno.

El término "*heterólogo*", como se usa en la presente descripción, incluye un agente o entidad de una fuente diferente. Por ejemplo, cuando se usa en referencia a un polipéptido, gen, o producto génico presente en una célula u organismo particular, el término aclara que el polipéptido, gen, o producto génico en cuestión: 1) se modificó genéticamente por la mano del hombre; 2) se introdujo en la célula u organismo (o un precursor de este) por la acción del hombre (por ejemplo, por medio de ingeniería genética); y/o 3) no se produce o no está presente naturalmente en la célula u organismo en cuestión (por ejemplo, el tipo de célula o el tipo de organismo en cuestión).

El término "*célula huésped*", como se usa en la presente descripción, incluye una célula en la cual se ha introducido un ácido nucleico o una proteína heterólogos (por ejemplo, exógenos). Después de leer esta descripción los expertos entenderán que tales términos no se refieren solamente a la célula particular en cuestión, sino que se usan, además, para referirse a la progenie de tal una célula. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en las generaciones posteriores ya sea debido a una mutación o a influencias del ambiente, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero aun así se incluye dentro del alcance del término "*célula huésped*" como se usa en la presente descripción. En algunos casos, una célula huésped es, o comprende, una célula procariota o eucariota. En general, una célula huésped es cualquier célula que sea adecuada para recibir y/o producir un ácido nucleico o una proteína heteróloga, independientemente del reino de la vida al que pertenece la célula. Las células ilustrativas incluyen las de organismos procariotas y eucariotas (unicelulares o pluricelulares), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., etcétera), células de micobacterias, células fúngicas, células de levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etcétera), células vegetales, células de insectos (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insectos infectadas con baculovirus, *Trichoplusia ni*, etcétera), células de animales no humanos, células humanas, o fusiones de células tales como, por ejemplo, híbridomas o cuádrimas. En algunos casos, la célula es una célula humana, de mono, simio, hámster, rata o ratón. En algunos casos, la célula es eucariota y se selecciona de las siguientes células: CRO (por ejemplo, CHO KI, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), célula de retina, Vero, CV1, renal (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, flak, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (por ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunos casos, la célula comprende uno o más genes virales, por ejemplo, una célula de retina que expresa un gen viral (por ejemplo, una célula PER.C6®). En algunos casos, una célula huésped es, o comprende, una célula aislada. En algunos casos, una célula huésped es parte de un tejido. En algunos casos, una célula huésped es parte de un organismo.

El término "*humanizado*", se usa en la presente descripción de acuerdo con su significado entendido en la técnica para referirse a ácidos nucleicos o proteínas cuyas estructuras (es decir, secuencias de nucleótidos o aminoácidos) incluyen porciones que corresponden sustancialmente o idénticamente a las estructuras de un gen o proteína particular que se encuentran en la naturaleza en un animal no humano, e incluyen, además, porciones que se diferencian de la encontrada en el gen o proteína no humanos particulares en cuestión y en lugar de eso corresponden de manera más cercana a estructuras comparables que se encuentran en un gen o proteína humanos correspondientes. En algunas modalidades, un gen "*humanizado*" es uno que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual a la de un polipéptido humano (por ejemplo, una proteína humana o porción de esta – por ejemplo, una porción característica de esta). Para proporcionar un ejemplo, en el caso de un receptor de membrana, un gen "*humanizado*" puede codificar un polipéptido que tiene una porción extracelular que tiene una secuencia de aminoácidos igual a la de una porción extracelular humana y la secuencia restante es igual a la de un polipéptido de roedor (por ejemplo, de ratón). En algunas modalidades, un gen humanizado comprende al menos una porción de una secuencia de ADN de un gen humano. En algunos casos, un gen humanizado comprende una secuencia de ADN completa de un gen humano. En algunas modalidades, una proteína humanizada comprende una secuencia que tiene una porción que aparece en una proteína humana. En algunos casos, una proteína humanizada comprende una secuencia completa de una proteína humana y se expresa a partir de un locus endógeno de un animal no humano.

que corresponde al homólogo o al ortólogo del gen humano.

El término "*identidad*", como se usa en la presente descripción en relación con una comparación de secuencias, incluye la identidad determinada mediante una serie de algoritmos diferentes conocidos en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos. En algunas modalidades, las identidades como se describen en la presente descripción, se determinan con el uso de un alineamiento ClustalW v. 1.83 (lento) que emplea una penalización por apertura de interrupción de 10,0, una penalización por extensión de interrupción de 0,1, y el uso de una matriz de similitud de Gonnet (MACVECTOR™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008).

"Mejorar", "aumentar", "eliminar" o "reducir", como se usa en la presente descripción o sus equivalentes gramaticales, indican valores que son relativos a una medición de referencia, tal como una medición en el mismo individuo (o animal) antes del inicio de un tratamiento descrito en la presente descripción, o una medición en un individuo (o animal) de control o múltiples individuos (o animales) de control en ausencia del tratamiento descrito en la presente descripción.

El término "*aislado*", como se usa en la presente descripción, incluye una sustancia y/o entidad que (1) se ha separado de al menos algunos de los componentes con los que se asociaba cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza y/o en un entorno experimental), y/o (2) se ha diseñado, producido, preparado y/o fabricado por acción del hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de alrededor de 10 %, alrededor de 20 %, alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 91 %, alrededor de 92 %, alrededor de 93 %, alrededor de 94 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más de alrededor de 99 % de los otros componentes con los que se asociaron inicialmente. En algunas modalidades, los agentes aislados son alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 91 %, alrededor de 92 %, alrededor de 93 %, alrededor de 94 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más de alrededor de 99 % puros. Como se usa en la presente descripción, una sustancia es "*pura*" si está sustancialmente libre de otros componentes. En algunas modalidades, como entenderán los expertos en la técnica, una sustancia aún puede considerarse "*aislada*" o incluso "*pura*", después de combinarse con otros componentes determinados tales como, por ejemplo, uno o más portadores o excipientes (por ejemplo, tampón, solvente, agua, etc.); en tales modalidades, el por ciento de aislamiento o pureza de la sustancia se calcula sin incluir tales portadores o excipientes. Para proporcionar un ejemplo, en algunas modalidades, un polímero biológico tal como un polipéptido o un polinucleótido que se produce en la naturaleza se considera "*aislado*" cuando: a) en virtud de su origen o fuente de obtención no se asocia con algunos o todos los componentes que lo acompañan en su estado nativo en la naturaleza; b) está sustancialmente libre de otros polipéptidos o ácidos nucleicos de la misma especie que la especie que lo produce en la naturaleza; o c) se expresa por, o se encuentra de cualquier otra manera en asociación con componentes de una célula u otro sistema de expresión que no es de la especie que lo produce en la naturaleza. Por lo tanto, por ejemplo, en algunas modalidades, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente del que lo produce en la naturaleza se considera un polipéptido "*aislado*". Alternativamente o adicionalmente, en algunas modalidades, un polipéptido que se ha sometido a una o más técnicas de purificación puede considerarse un polipéptido "*aislado*" en la medida que se ha separado de otros componentes: a) con los que se asocia en la naturaleza; y/o b) con los que se asociaba cuando se produjo inicialmente.

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

La frase "*ácido nucleico*", como se usa en la presente descripción, en su sentido más amplio, incluye cualquier compuesto y/o sustancia que es una cadena oligonucleotídica o que puede incorporarse a esta. En algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" es un compuesto y/o sustancia que es una cadena oligonucleotídica o que puede incorporarse a esta por medio de un enlace fosfodiéster. Como resultará evidente por el contexto, en algunas modalidades, "*ácido nucleico*" incluye residuos de ácidos nucleicos individuales (por ejemplo, nucleótidos y/o nucleósidos); en algunas modalidades, "*ácido nucleico*" incluye una cadena oligonucleotídica que comprende residuos de ácidos nucleicos individuales. En algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" es o comprende ARN; en algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" es o comprende ADN. En algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" es, comprende, o consiste en uno o más residuos de ácidos nucleicos naturales. En algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" es, comprende, o consiste en uno o más análogos de ácidos nucleicos. En algunas modalidades, un análogo de ácido nucleico se diferencia de un "*ácido nucleico*" en que no utiliza una cadena principal con enlaces fosfodiéster. Por ejemplo, en algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" es, comprende, o consiste en uno o más "*ácidos nucleicos peptídicos*", que se conocen en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en la cadena principal, y se consideran dentro del alcance descrito de la presente invención. Alternativamente o adicionalmente, en algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" tiene uno o más enlaces fosforotioato y/o 5'-N-fosforamidita en lugar de enlaces fosfodiéster. En algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" es, comprende, o consiste en uno o más nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosa, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina). En algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" es, comprende, o consiste en uno o más análogos de nucleósidos (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolopirimidina, 3-

metiladenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinilcitidina, C-5 propiniluridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propiniluridina, C5-propinilcitidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina, 2-tiocitidina, bases metiladas, bases intercaladas y sus combinaciones). En algunas modalidades, un "ácido nucleico" comprende uno o más azúcares modificados (por ejemplo, 2' - fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa) en comparación con las de los ácidos nucleicos naturales. En algunas modalidades, un "ácido nucleico" tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico funcional tal como un ARN o una proteína. En algunas modalidades, un "ácido nucleico" incluye uno o más intrones. En algunas modalidades, un "ácido nucleico" incluye uno o más exones. En algunas modalidades, un "ácido nucleico" se prepara mediante uno o más de aislamiento a partir de una fuente natural, síntesis enzimática por polimerización basada en una plantilla complementaria (*in vivo* o *in vitro*), reproducción en una célula o sistema recombinante, y síntesis química. En algunas modalidades, un "ácido nucleico" tiene al menos 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 o más residuos de largo. En algunas modalidades, un "ácido nucleico" es monocatenario; en algunas modalidades, un "ácido nucleico" es bicatenario. En algunas modalidades, un "ácido nucleico" tiene una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un elemento que codifica, o es el complemento de una secuencia que codifica, un polipéptido. En algunas modalidades, un "ácido nucleico" tiene actividad enzimática.

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

El término "polipéptido", como se usa en la presente descripción, incluye cualquier cadena polimérica de aminoácidos. En algunas modalidades, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que se produce en la naturaleza. En algunas modalidades, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que no se produce en la naturaleza. En algunas modalidades, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que contiene porciones que se producen en la naturaleza separadas entre sí (es decir, de dos o más organismos diferentes, por ejemplo, porciones humanas y no humanas). En algunas modalidades, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que está modificada genéticamente dado que se diseña y/o produce mediante la acción del hombre.

"Prevenir" o "prevención", como se usa en la presente descripción cuando se usa en relación con la aparición de una enfermedad, trastorno y/o afección, incluye reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad, trastorno y/o afección y/o retrasar la aparición de una o más características o síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. La prevención puede considerarse completa cuando la aparición de una enfermedad, trastorno o afección se ha retrasado durante un período de tiempo predefinido.

El término "recombinante", como se usa en la presente descripción, se refiere a polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos PD-L1 como se describen en la presente descripción) diseñados, modificados, preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como polipéptidos expresados mediante el uso de un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, polipéptidos aislados a partir de una biblioteca combinatoria, de polipéptidos humanos recombinantes (Hoogenboom H. R., (1997) TIB Tech. 15:62-70; Hoogenboom H. y Chames P., 2000, Immunology Today 21:371-378; Azzazy H. y Highsmith W. E., (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J. V. y Larrick J. W. (2002) BioTechniques 29:128-145), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulinas humanas (ver, por ejemplo, Taylor, L. D. y otros, (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Little M. y otros, 2000, Immunology Today 21:364-370; Kellermann S. A. y Green L. L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Murphy, A.J. y otros, (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111(14):5153-5158) o polipéptidos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que involucre el corte y empalme entre elementos de secuencia seleccionados entre sí. En algunas modalidades, uno o más de tales elementos de secuencia seleccionados se encuentran en la naturaleza. En algunas modalidades, uno o más de tales

elementos de secuencia seleccionados se diseñan *in silico*. En algunas modalidades, uno o más de tales elementos de secuencia seleccionados son el resultado de la mutagénesis (por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*) de un elemento de secuencia conocido, por ejemplo, de una fuente natural o sintética. Por ejemplo, en algunas modalidades, un polipéptido recombinante comprende secuencias que se encuentran en el genoma de un organismo fuente de interés (por ejemplo, humano, ratón, etcétera). El polipéptido recombinante comprende secuencias que se producen en la naturaleza separadas entre sí (es decir, de dos o más organismos diferentes, por ejemplo, porciones humanas y de roedor) en dos organismos diferentes (por ejemplo, un organismo humano y uno no humano). En algunas modalidades, un polipéptido recombinante tiene una secuencia de aminoácidos que es el resultado de la mutagénesis (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, en un roedor), de manera que las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos recombinantes son secuencias que, si bien se originan de secuencias de polipéptidos y se relacionan con estas, pueden no existir naturalmente dentro del genoma de un roedor *in vivo*.

El término "*reemplazo*" se usa en la presente descripción para referirse a un proceso a través del cual una secuencia de ácido nucleico "*reemplazada*" (por ejemplo, un gen) que se encuentra en un locus hospedero (por ejemplo, en un genoma) se elimina de ese locus, y un ácido nucleico diferente, de "*reemplazo*" se sitúa en su lugar. En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico reemplazada y las secuencias de ácidos nucleicos de reemplazo son comparables entre sí dado que, por ejemplo, son homólogas entre sí y/o contienen elementos correspondientes (por ejemplo, elementos que codifican proteínas, elementos reguladores, etcétera). En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico reemplazada incluye uno o más de un promotor, un potenciador, un sitio donante de corte y empalme, un sitio receptor de corte y empalme, un intrón, un exón, una región no traducida (UTR); en algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de reemplazo incluye una o más secuencias codificantes. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de reemplazo es un homólogo de la secuencia de ácido nucleico reemplazada. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de reemplazo es un ortólogo de la secuencia reemplazada. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de reemplazo es, o comprende, una secuencia de ácido nucleico humana. En algunas modalidades, que incluyen cuando la secuencia de ácido nucleico de reemplazo es, o comprende, una secuencia de ácido nucleico humana, la secuencia de ácido nucleico reemplazada es, o comprende, una secuencia de roedor (por ejemplo, una secuencia de ratón o de rata). La secuencia de ácido nucleico así colocada puede incluir una o más secuencias reguladoras que son parte de la secuencia de ácido nucleico fuente usada para obtener la secuencia así colocada (por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones 5' o 3' no traducidas, etcétera). Por ejemplo, en varias modalidades, el reemplazo es una sustitución de una secuencia endógena con una secuencia heteróloga que da como resultado la producción de un producto génico a partir de la secuencia de ácido nucleico así colocada (que comprende la secuencia heteróloga), pero no la expresión de la secuencia endógena; el reemplazo es de una secuencia genómica endógena con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene una función similar a la de una proteína codificada por la secuencia endógena (por ejemplo, la secuencia genómica endógena codifica una proteína PD-L1, y el fragmento de ADN codifica una o más proteínas PD-L1 humanas). En varias modalidades, un gen endógeno o un fragmento de este se reemplaza con un gen humano correspondiente o un fragmento de este. Un gen humano correspondiente o un fragmento de este es un gen humano o un fragmento que es un ortólogo de, o es sustancialmente similar o igual en estructura y/o función, al gen endógeno o fragmento de este que se reemplaza.

El término "*referencia*" se usa en la presente descripción para describir un estándar o agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de control contra el cual se compara un agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés. En algunas modalidades, un agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia se evalúa y/o se determina sustancialmente de manera simultánea con la prueba o determinación del agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés. En algunas modalidades, un agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia es una referencia histórica, materializada opcionalmente en un medio tangible. En algunas modalidades, una referencia puede referirse a un control. Como se usa en la presente descripción, una "*referencia*" puede incluir un "*animal de referencia*". Un "*animal de referencia*" puede tener una modificación como se describe en la presente descripción, una modificación que es diferente a como se describe en la presente descripción o puede no tener modificaciones (es decir, un animal de tipo silvestre). Típicamente, como entenderán los expertos en la técnica, un agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia se determina o caracteriza en condiciones comparables a las utilizadas para determinar o caracterizar el agente, animal (por ejemplo, un mamífero), cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés.

El término "*sustancialmente*", como se usa en la presente descripción, incluye la condición cualitativa de exhibir una medida o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en las técnicas biológicas comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos raramente, o nunca, llegan a completarse y/o se completan o logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "*sustancialmente*" se usa en la presente descripción para capturar la carencia potencial de totalidad inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos.

La frase "*homología sustancial*", como se usa en la presente descripción, incluye una comparación entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la técnica, generalmente dos secuencias se consideran "*sustancialmente homólogas*" si contienen residuos homólogos en posiciones correspondientes. Los residuos homólogos pueden ser residuos idénticos. Alternativamente, los residuos homólogos pueden ser residuos no idénticos con características estructurales y/o funcionales adecuadamente similares. Por ejemplo, como bien conocen

los expertos en la técnica, determinados aminoácidos se clasifican típicamente como aminoácidos "*hidrófobos*" o "*hidrófilos*", y/o que tienen cadenas laterales "*polares*" o "*no polares*". La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo puede considerarse frecuentemente una sustitución "*homóloga*". Las clasificaciones de aminoácidos típicas se resumen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1

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

Tabla 2

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

Como se conoce bien en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos pueden compararse mediante el uso de cualquiera de una variedad de algoritmos, que incluyen los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para las secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST con huecos, y PSI-BLAST para las secuencias de aminoácidos. Tales programas ilustrativos se describen en Altschul S. F. y otros, 1990, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410; Altschul, S. F. y otros, 1997, Methods in Enzymology; Altschul, S. F. y otros, 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402; Baxevanis, A.D., y B. F. F. Ouellette (eds.) Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener y otros (eds.) Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1998. Además de identificar las secuencias homólogas, los programas mencionados anteriormente típicamente proporcionan una indicación del grado de homología. En algunas modalidades, dos secuencias se consideran sustancialmente homólogas si al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus residuos correspondientes son homólogos en un segmento de residuos en cuestión. En algunas modalidades, el segmento en cuestión es una secuencia completa. En algunas modalidades, el segmento en cuestión es de al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o más residuos. En algunas modalidades, el segmento en cuestión incluye residuos contiguos a lo largo de una secuencia completa. En algunas modalidades, el segmento en cuestión incluye residuos discontinuos a lo largo de una secuencia completa, por ejemplo, residuos no contiguos reunidos por la conformación plegada de un polipéptido o una porción del mismo. En algunas modalidades, el segmento en cuestión es de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más residuos.

La frase "*identidad sustancial*", como se usa en la presente descripción, incluye una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la técnica, generalmente, dos secuencias se consideran "*sustancialmente idénticas*" si contienen residuos idénticos en las posiciones correspondientes. Como se conoce bien en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos pueden compararse mediante el uso de cualquiera de una variedad de algoritmos, que incluyen los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para las secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST con huecos, y PSI-BLAST para las secuencias de aminoácidos. Tales programas ilustrativos se describen en Altschul S. F. y otros, 1990, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410; Altschul, S. F. y otros, 1997, Methods in Enzymology; Altschul, S. F. y otros, 1997, Nucleic Acids

Res., 25:3389-3402; Baxeavanis, A.D., y B. F. F. Ouellette (eds.) Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener y otros (eds.) Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1998. Además de identificar secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente típicamente proporcionan una indicación del grado de identidad. En algunas modalidades, dos secuencias se consideran sustancialmente idénticas si al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus residuos correspondientes son idénticos en un segmento de residuos en cuestión. En algunas modalidades, el segmento en cuestión es una secuencia completa. En algunas modalidades, el segmento en cuestión es de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más residuos.

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

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

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

El término "*vector*", como se usa en la presente descripción, incluye una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se asocia. En algunas modalidades, los vectores son capaces de replicarse de manera extracromosómica y/o expresar los ácidos nucleicos a los que se encuentran unidos en una célula huésped tal como una célula eucariota y/o procariota. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes unidos operativamente se denominan en la presente descripción "*vectores de expresión*".

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

Descripción detallada de determinadas modalidades

La presente invención proporciona, entre otras cosas, roedores mejorados y/o modificados genéticamente que tienen material genético humanizado que codifica un polipéptido del ligando de muerte programada 1 (PD-L1), como se expone en las reivindicaciones, que son adecuados para determinar la eficacia terapéutica de moduladores de PD-L1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1) para el tratamiento del cáncer, enfermedades autoinmunitarias y patógenos infecciosos, así como también ensayos de respuestas y función de las células inmunitarias. Se contempla que tales roedores proporcionen una mejora en la determinación de la eficacia terapéutica de moduladores de PD-L1 y su potencial para el bloqueo de PD-1 :PD-L1 (o PD-L1 :B7-1). Por lo tanto, la presente invención es particularmente útil para el desarrollo de terapias con anti-PD-L1 y, en algunas modalidades, anti-PD-1, para el tratamiento de varios cánceres, enfermedades autoinmunitarias, así como también para aumentar las respuestas inmunitarias para tratar y/o mejorar etiologías infecciosas. En particular, la presente invención abarca la humanización de un gen de CD274 de roedor que da como resultado la expresión de un polipéptido PD-L1 humanizado en la superficie de células del roedor. Tales roedores con PD-L1 humanizado tienen la capacidad de proporcionar una fuente de células humanas PD-L1⁺ para determinar la eficacia de agentes terapéuticos anti-PD-L1 para promover respuestas inmunitarias antitumorales. Tales roedores con PD-L1 humanizado también tienen la capacidad de proporcionar una fuente de células humanas PD-L1⁺ para determinar la eficacia de agentes terapéuticos anti-PD-L1 para mejorar una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria. Además, tales roedores con PD-L1 humanizado proporcionan un sistema *in vivo* para el cribado y desarrollo de terapias con anti-PD-L1 para el tratamiento de varios cánceres, enfermedades autoinmunitarias y enfermedades infecciosas. En algunos casos, la eficacia del tratamiento puede demostrarse en roedores de la presente invención mediante una disminución o desaparición de signos y/o síntomas de la enfermedad, trastorno o afección; en algunos casos, una disminución o desaparición de algunos, pero no todos, los signos y síntomas de la enfermedad, trastorno o afección, en algunos casos, una disminución o desaparición de todos los signos y síntomas de la enfermedad, trastorno o afección, aunque la enfermedad, trastorno o afección todavía puede estar en el cuerpo del roedor. En varios casos, la enfermedad, trastorno o afección se asocia con un cáncer. En varios casos, la enfermedad, trastorno o afección se asocia con una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria. En varios casos, la enfermedad, trastorno o afección se asocia con un patógeno infeccioso (por ejemplo, una bacteria).

En algunas modalidades, los roedores de la presente invención demuestran respuestas inmunitarias moduladas por medio del bloqueo de la señalización de PD-1 :PD-L1 a través del polipéptido PD-L1 humanizado expresado en la superficie de células del roedor. En algunas modalidades, los polipéptidos PD-L1 humanizados tienen una secuencia correspondiente a los dominios V y C de inmunoglobulina, en su totalidad o en parte, de un polipéptido PD-L1 humano. Los polipéptidos PD-L1 humanizados tienen una secuencia que corresponde sustancialmente a la totalidad del dominio extracelular de un polipéptido PD-L1 humano. Los polipéptidos PD-L1 humanizados tienen una secuencia correspondiente a los dominios transmembrana y citoplasmático de un polipéptido PD-L1 de roedor. En algunas modalidades, los polipéptidos PD-L1 humanizados tienen una secuencia correspondiente a los residuos de aminoácidos 19-238 (o 19-227 o 19-131) de un polipéptido PD-L1 de roedor. Los roedores de la presente invención comprenden un gen de CD274 que contiene material genético del roedor y de un ser humano. En algunas modalidades, los roedores de la presente invención comprenden un gen de CD274 humanizado, en donde el gen de CD274 humanizado comprende el exón 3, el exón 4 y el exón 5 en su totalidad o en parte, de un gen *CD274* humano. En algunas modalidades determinadas, los roedores de la presente invención comprenden un gen de *CD274* humanizado, en donde el gen de *CD274* humanizado comprende alrededor de 4494 pb de un gen *CD274* humano correspondientes al exón 3 y alrededor de 4160 pb de la secuencia genómica humana 3' del exón 3. En algunas modalidades determinadas, los roedores de la presente invención comprenden un gen de *CD274* humanizado, en donde el gen de *CD274* humanizado comprende alrededor de 3950 pb de un gen *CD274* de roedor correspondientes a alrededor de 1253 pb de la secuencia genómica humana 5' del exón 4, el exón 4, el intrón 4 y los primeros 32 pb del exón 5 de un gen *CD274* humano. En algunas modalidades determinadas, los roedores de la presente invención comprenden un gen de *CD274* humanizado, en donde el gen de *CD274* humanizado comprende alrededor de 4494 pb y alrededor de 3950 pb de un gen *CD274* humano yuxtapuestos con un sitio de recombinación sitio específica (por ejemplo, un sitio *loxP*), cuyos 4494 pb y 3950 pb corresponden al exón 3, el exón 4 y los primeros 32 pb del exón 5 de

un gen *CD274* humano. En algunas modalidades determinadas, los roedores de la presente invención comprenden un gen de *CD274* humanizado, en donde el gen de *CD274* humanizado comprende alrededor de 8444 pb de un gen *CD274* humano correspondientes al exón 3, el exón 4 y los primeros 32 pb del exón 5 de un gen *CD274* humano. En algunas modalidades, los roedores (por ejemplo, ratones o ratas) de la presente invención comprenden un gen de *CD274* humanizado, en donde el gen de *CD274* humanizado comprende el exón 3, el exón 4 y una porción del exón 5 de un gen *CD274* humano, unidos operativamente a los exones 1, 2, una porción del exón 5, el exón 6 y 7 de un gen *Cd274* endógeno de roedor; y en modalidades específicas, el gen de *CD274* humanizado codifica un polipéptido PD-L1 humanizado que incluye la totalidad o sustancialmente la totalidad del dominio extracelular de un polipéptido PD-L1 humano, y la totalidad o sustancialmente la totalidad de los dominios transmembrana y citoplasmático de un polipéptido PD-L1 de roedor. En algunas modalidades determinadas, los roedores de la presente invención comprenden un gen de *CD274* humanizado representado en la Figura 2.

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

Gen del grupo de diferenciación 274 (*CD274*)

CD274, que codifica un polipéptido denominado ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1, también denominado B7-H1), se descubrió mediante la búsqueda en la base de datos de etiquetas de secuencia expresada humana (EST) mediante el uso de los miembros de la familia B7 B7-1 y B7-2 (Dong, H. y otros, 1999, *Nature Med.* 5(12):1365-1369; Freeman, G. J. y otros, 2000, *J. Exp. Med.* 192(7):1027-1034). El gen de *CD274* consiste en siete exones cada uno de los cuales codifica porciones distintas del polipéptido PD-L1; exón 1: no codificante y contiene 5'UTR; exón 2: secuencia señal; exón 3: dominio V de inmunoglobulina (IgV); exón 4: dominio C de inmunoglobulina (IgC); exón 5: parte C-terminal del dominio extracelular y dominio transmembrana; exón 6: dominio intracelular; y exón 7: ~ 6 residuos de aminoácidos del dominio intracelular y la 3'UTR. El polipéptido PD-L1 comparte una organización estructural común con otros miembros de la familia B7 (B7-1 y B7-2) a pesar de un bajo por ciento de identidad de secuencia (~20 %). Por el contrario, las secuencias de polipéptido PD-L1 de ratón y de hombre comparten alrededor de un 70 % de identidad de secuencia (Freeman, G. J. y otros, supra). PD-L1 se expresa fuertemente en corazón, músculo esquelético, placenta y pulmón, se expresa débilmente en timo, bazo, riñón e hígado, y no se expresa en cerebro, colon o intestino delgado (Dong, H. y otros, supra). Además, PD-L1 se expresa constitutivamente en células T, células B, células mieloides (por ejemplo, células dendríticas, macrófagos, mastocitos, etcétera) y queratinocitos en ratón, mientras que se ha informado la expresión en las mismas células en seres humanos después de la activación (por ejemplo, en la reseña de Keir, M.E., y otros, 2008, *Annu. Rev. Immunol.* 26:677-704). De hecho, se ha informado que el promotor de *CD274* para los genes de ratón y humano contiene sitios de unión para el factor regulador de interferón 1 (IRF-1), que se ha sugerido como el responsable de la regulación positiva de PD-L1 en células cancerosas humanas (Lee, S. J. y otros, 2006, *FEBS Lett.* 580(3):755-762). Se han informado variantes de corte y empalme de PD-L1 (ver, por ejemplo, a continuación y en He, X. H. y otros, 2005, *Acta Pharmacol Sin.* 26(4):462-468), sin embargo, aún no se ha descubierto una relación causal con ninguna enfermedad. PD-L1 se une a PD-1 exclusivamente sin ninguna interacción con otras proteínas estructuralmente similares a PD-1 (CTLA4, CD28, ICOS; ver Dong, H. y otros y Freeman, G. J. y otros, supra). El acoplamiento de PD-L1 con PD-1 conduce a una variedad de funciones estimuladoras o inhibitoras en las células inmunitarias, algunas de las cuales incluyen la proliferación celular, la producción de citocinas y la señalización del receptor de células T y del receptor de células B. También se ha sugerido que PD-L1 (así como PD-L2) está involucrado en la señalización bidireccional (por ejemplo, ver Dong, H. y otros, 2003, *J. Clin. Invest.* 111:363-370; Kuipers, H. y otros, 2006, *Eur. J. Immunol.* 36:2472-2782). Curiosamente, se ha demostrado que PD-L1 se une a B7-1 (CD80), un ligando de CD28, aunque no se ha informado la interacción con el propio CD28 (Butte, M. J. y otros, 2007, *Immunity* 27:111-122). Esta interacción única con B7-1 ha sido particularmente importante por sus implicaciones en la regulación de las respuestas de células T y la tolerancia. De hecho, debido a los múltiples resultados funcionales proporcionados por sus funciones coestimuladoras y coinhibidoras, PD-L1 ha atraído mucho interés como una diana potencial para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, así como el tratamiento del cáncer. De hecho, la terapia con anti-PD-L1 se evalúa actualmente en ensayos clínicos en seres humanos (ver, por ejemplo, Pedoeem, A. y otros, 2014, *Clin. Immunol.* 153:145-152; y Philips, G.K. y Atkins, M., 2014, *Intern. Immunol.* 8 páginas).

Se necesita una comprensión más completa y detallada de las funciones mediadas por PD-L1 en muchos de los tipos de células en las que se expresa (por ejemplo, células no linfoides) y las interacciones únicas con otros miembros de la familia B7 para desarrollar terapias dirigidas prácticas para el tratamiento del cáncer y la autoinmunidad en el futuro.

Secuencias de CD274 y PD-L1 (B7-H1)

Las secuencias ilustrativas de *CD274* y PD-L1 murinas, humanas y humanizadas se exponen en la Figura 6. En la Figura 6 también se exponen las secuencias de ácidos nucleicos humanas ilustrativas para la humanización de un gen de *CD274* no humano. Para las secuencias de ARNm, la letra en negrita indica la secuencia codificante y los exones consecutivos, cuando se indican, se encuentran separados por texto subrayado alterno; para las secuencias de ARNm humanizadas, las secuencias humanas se encuentran dentro de paréntesis. Para las secuencias de proteínas, los péptidos señal se encuentran subrayados, las secuencias extracelulares con letra en negrita, las

secuencias de dominio V de inmunoglobulina (IgV) se encuentran dentro de paréntesis y las secuencias intracelulares en cursiva; para las secuencias de proteínas humanizadas, las secuencias no humanas se indican en letra normal y las secuencias humanas se indican en letra en negrita.

Las variantes de transcripción de CD274 se conocen en la técnica. Una variante de transcripción carece de un exón en marco en la región codificante 5' en comparación con la secuencia canónica (ver la Figura 6) y da como resultado una delección de los residuos 17-130 (es decir, el dominio IgV más ~5 residuos de aminoácidos). Las secuencias de ARNm y proteína de esta variante pueden encontrarse en los números de acceso de Genbank NM_001267706.1 y NP_001254635.1, respectivamente. Otra variante codifica una proteína soluble que tiene una sustitución K178D y una delección de los residuos 179-290. Las secuencias de ARNm y proteína de esta variante pueden encontrarse en los números de acceso de Genbank XM_006716759.1 y XP_006716822.1, respectivamente. Se ha descrito una tercera variante (NR_052005.1) que carece de un segmento interno alternativo en comparación con la secuencia canónica y, por lo tanto, se representa como una variante no codificante porque el uso del codón de inicio de traducción soportado más 5' hace que el transcrito sea un candidato para la degradación del ARNm por pérdida de sentido (NMD). Otras isoformas se describen en el documento WO 2014/197369.

Roedores con CD274 humanizado

Se proporcionan roedores, como se expone en las reivindicaciones, que pueden expresar polipéptidos PD-L1 humanizados en la superficie de células de los roedores como resultado de una modificación genética de un locus de CD274 endógeno del roedor que codifica un polipéptido PD-L1. Los ejemplos adecuados descritos en la presente descripción incluyen, en algunas modalidades, ratones.

Un gen de CD274 humanizado comprende material genético de un ser humano, en donde el gen de CD274 humanizado codifica un polipéptido PD-L1 que comprende la porción codificada del material genético de la especie heteróloga. El gen de CD274 humanizado de la presente invención comprende ADN genómico de una especie heteróloga que codifica la porción extracelular de un polipéptido PD-L1 que se expresa en la membrana plasmática de una célula. También se describen en la presente descripción roedores, embriones, células y constructos de transformación para producir roedores, embriones de roedores y células que contienen dicho gen de CD274 humanizado.

En algunas modalidades, se elimina un gen de CD274 endógeno. En algunas modalidades, se altera un gen de CD274 endógeno, en donde una porción del gen de CD274 endógeno se reemplaza con una secuencia de *CD274* humana, en su totalidad o en parte. Una porción de un gen de CD274 heterólogo puede insertarse en un gen de CD274 endógeno de roedor en un locus de CD274 endógeno. El gen heterólogo es un gen humano. En algunas modalidades, la modificación o humanización se realiza a una de las dos copias del gen de CD274 endógeno, lo que da lugar a un roedor que es heterocigoto con respecto al gen de CD274 humanizado. En otras modalidades, se proporciona un roedor que es homocigoto para un gen de CD274 humanizado.

En varios aspectos, un roedor contiene un gen *CD274* humano, en parte, en un locus de CD274 endógeno de roedor. En algunas modalidades, un roedor contiene un gen *CD274* humano, en un sitio fuera de un locus de CD274 endógeno de roedor. Por lo tanto, tales roedores pueden describirse como que tienen un gen de CD274 heterólogo. El gen de CD274 reemplazado, insertado, modificado o alterado en el locus de CD274 endógeno o un polipéptido expresado a partir de tal gen puede detectarse mediante el uso de una variedad de métodos que incluyen, por ejemplo, PCR, inmunoelectrotransferencia, transferencia Southern, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), o un ensayo de ganancia o pérdida de alelos. En algunas modalidades, el roedor es heterocigoto con respecto al gen de CD274 humanizado.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene un tercer exón que tiene una secuencia al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a un tercer exón que aparece en una secuencia de ARNm de CD274 humano de la Figura 6.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene un tercer exón que tiene una secuencia que es sustancialmente idéntica a un tercer exón que aparece en una secuencia de ARNm de *CD274* humano de la Figura 6.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene un tercer exón que tiene una secuencia que es idéntica a un tercer exón que aparece en una secuencia de ARNm de *CD274* humano de la Figura 6.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene un cuarto exón que tiene una secuencia al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a un cuarto exón que aparece en una secuencia de ARNm de *CD274* humano de la Figura 6.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene un cuarto exón que tiene una secuencia que es sustancialmente idéntica a un cuarto exón que aparece en una secuencia de ARNm de *CD274* humano de la Figura 6.

5 En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene un cuarto exón que tiene una secuencia que es idéntica a un cuarto exón que aparece en una secuencia de ARNm de CD274 humano de la Figura 6.

10 En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene un quinto exón que tiene una secuencia al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a un quinto exón que aparece en una secuencia de ARNm de CD274 humanizado de la Figura 6.

15 En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene un quinto exón que tiene una secuencia que es sustancialmente idéntica a un quinto exón que aparece en una secuencia de ARNm de CD274 humanizado de la Figura 6.

20 En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene un quinto exón que tiene una secuencia que es idéntica a un quinto exón que aparece en una secuencia de ARNm de CD274 humanizado de la Figura 6.

25 En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene un tercer, cuarto y quinto exón, cada uno de los cuales tiene una secuencia al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a un tercer, cuarto y quinto exón que aparece en una secuencia de ARNm de CD274 humanizado de la Figura 6.

30 En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene un tercer, cuarto y quinto exón, cada uno de los cuales tiene una secuencia que es sustancialmente idéntica a un tercer, cuarto y quinto exón que aparece en una secuencia de ARNm de CD274 humanizado de la Figura 6.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene un tercer, cuarto y quinto exón, cada uno de los cuales tiene una secuencia que es idéntica a un tercer, cuarto y quinto exón que aparece en una secuencia de ARNm de CD274 humanizado de la Figura 6.

35 En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene un primer, segundo, sexto y séptimo exón, cada uno de los cuales tiene una secuencia al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica al primer, segundo, sexto y séptimo exón que aparece en una secuencia de ARNm de *Cd274* de ratón de la Figura 6.

40 En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene un primer, segundo, sexto y séptimo exón, cada uno de los cuales tiene una secuencia que es sustancialmente idéntica a un primer, segundo, sexto y séptimo exón que aparece en una secuencia de ARNm de *Cd274* de ratón de la Figura 6.

45 En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene un primer, segundo, sexto y séptimo exón, cada uno de los cuales tiene una secuencia que es idéntica a un primer, segundo, sexto y séptimo exón que aparece en una secuencia de ARNm de *Cd274* de ratón de la Figura 6.

50 En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que comprende una secuencia al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a la SEQ ID NO:12.

55 En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que comprende una secuencia que es sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO: 12.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que comprende una secuencia que es idéntica a la SEQ ID NO: 12.

60 En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que comprende una secuencia al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a la SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:16.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que comprende una secuencia que es sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO: 16.

65 En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274

que comprende una secuencia que es idéntica a la SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:16.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que comprende una primera secuencia al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a SEQ ID NO: 13 y una segunda

5 secuencia al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a la SEQ ID NO: 16.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que comprende una primera secuencia que es sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO:13 y una segunda secuencia

10 que es sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO: 16.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que comprende una primera secuencia que es idéntica a la SEQ ID NO:13 y una segunda secuencia que es idéntica

15 a la SEQ ID NO: 16.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención comprende la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO:16 y un sitio de reconocimiento de recombinasa sitio específica, en donde dicho sitio de

20 reconocimiento de recombinasa sitio específica se encuentra dentro de un intrón de dicho gen de CD274 humanizado.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que comprende un intrón entre un exón 3 de CD274 y un exón 4 de CD274, en donde dicho intrón comprende una

25 secuencia que es sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO: 17.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que comprende un intrón entre un exón 3 de CD274 y un exón 4 de CD274, en donde dicho intrón comprende una

30 secuencia que es idéntica a la SEQ ID NO:17.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que comprende la SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:17.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que comprende la SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16.

35 En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que comprende la SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene una secuencia de nucleótidos codificante (por ejemplo, una secuencia de ADNc) al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o

40 más) idéntica a una secuencia de nucleótidos codificante que aparece en una secuencia de nucleótidos codificante de CD274 humanizado de la Figura 6.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene una secuencia de nucleótidos codificante (por ejemplo, una secuencia de ADNc) que es sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleótidos codificante que aparece en una secuencia de nucleótidos codificante de

45 CD274 humanizado de la Figura 6.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD274 que tiene una secuencia de nucleótidos codificante (por ejemplo, una secuencia de ADNc) que es idéntica a una secuencia de nucleótidos codificante que aparece en una secuencia de nucleótidos codificante de CD274 humanizado

50 de la Figura 6.

En varias modalidades, una secuencia de ARNm de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una secuencia de ARNm de CD274 humanizado

55 de la Figura 6.

En varias modalidades, una secuencia de ARNm de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia que es sustancialmente idéntica a una secuencia de ARNm de CD274 humanizado de la

60 Figura 6.

En varias modalidades, una secuencia de ARNm de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia que es idéntica a una secuencia de ARNm de CD274 humanizado de la Figura 6.

En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención codifica un polipéptido PD-L1 que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una secuencia de aminoácidos de PD-L1

65 En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención codifica un polipéptido PD-L1 que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una secuencia de aminoácidos de PD-L1

80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una secuencia de polipéptido PD-L1 de la Figura 6.

5 En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención codifica un polipéptido PD-L1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una secuencia de polipéptido PD-L1 de la Figura 6.

10 En varias modalidades, un gen de CD274 humanizado de acuerdo con la presente invención codifica un polipéptido PD-L1 que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de polipéptido PD-L1 de la Figura 6.

15 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 humanizado producido por un roedor de la presente invención tiene una porción extracelular que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una porción extracelular de un polipéptido PD-L1 humano que aparece en la Figura 6.

20 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención tiene una porción extracelular que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una porción extracelular de un polipéptido PD-L1 humano que aparece en la Figura 6.

25 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención tiene una porción extracelular que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una porción extracelular de un polipéptido PD-L1 humano que aparece en la Figura 6.

30 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a los residuos de aminoácidos 19-131 que aparecen en un polipéptido PD-L1 humano o humanizado de la Figura 6.

35 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a los residuos de aminoácidos 19-131 que aparecen en un polipéptido PD-L1 humano o humanizado de la Figura 6.

40 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a los residuos de aminoácidos 19-131 que aparecen en un polipéptido PD-L1 humano o humanizado de la Figura 6.

45 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a los residuos de aminoácidos 19-227 que aparecen en un polipéptido PD-L1 humano o humanizado de la Figura 6.

50 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a los residuos de aminoácidos 19-227 que aparecen en un polipéptido PD-L1 humano o humanizado de la Figura 6.

55 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a los residuos de aminoácidos 19-227 que aparecen en un polipéptido PD-L1 humano o humanizado de la Figura 6.

60 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a los residuos de aminoácidos 19-238 que aparecen en un polipéptido PD-L1 humano o humanizado de la Figura 6.

65 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a los residuos de aminoácidos 19-238 que aparecen en un polipéptido PD-L1 humano o humanizado de la Figura 6.

En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a los residuos de aminoácidos 19-238 que aparecen en un polipéptido PD-L1 humano o humanizado de la Figura 6.

En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención tiene un dominio V de inmunoglobulina (IgV) que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50 % (por ejemplo 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a un dominio IgV de un polipéptido PD-L1 humano que aparece en la Figura 6.

En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención tiene un dominio V de inmunoglobulina (IgV) que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a un dominio IgV de un polipéptido PD-L1 humano que aparece en la Figura 6.

5 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención tiene un dominio V de inmunoglobulina (IgV) que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a un dominio IgV de un polipéptido PD-L1 humano que aparece en la Figura 6.

10 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención tiene un dominio V de inmunoglobulina (IgV) y un dominio C de inmunoglobulina (IgC), cada uno de los cuales tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a un dominio IgV y un dominio IgC de un polipéptido PD-L1 humano que aparece en la Figura 6.

15 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención tiene un dominio V de inmunoglobulina (IgV) y un dominio C de inmunoglobulina (IgC), cada uno de los cuales tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a un dominio IgV y un dominio IgC de un polipéptido PD-L1 humano que aparece en la Figura 6.

20 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención tiene un dominio V de inmunoglobulina (IgV) y un dominio C de inmunoglobulina (IgC), cada uno de los cuales tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a un dominio IgV y un dominio IgC de un polipéptido PD-L1 humano que aparece en la Figura 6.

25 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención tiene un dominio transmembrana y un dominio intracelular, cada uno de los cuales tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a un dominio transmembrana y un dominio intracelular de un polipéptido PD-L1 de ratón que aparece en la Figura 6.

30 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención tiene un dominio transmembrana y un dominio intracelular, cada uno de los cuales tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a un dominio transmembrana y un dominio intracelular de un polipéptido PD-L1 de ratón que aparece en la Figura 6.

35 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención tiene un dominio transmembrana y un dominio intracelular, cada uno de los cuales tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a un dominio transmembrana y un dominio intracelular de un polipéptido PD-L1 de ratón que aparece en la Figura 6.

40 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido PD-L1 humanizado que aparece en la Figura 6.

45 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido PD-L1 humanizado que aparece en la Figura 6.

50 En varias modalidades, un polipéptido PD-L1 producido por un roedor de la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido PD-L1 humanizado que aparece en la Figura 6.

55 En la presente descripción se describen composiciones y métodos para producir roedores que expresan un polipéptido PD-L1 humanizado, que incluye formas polimórficas específicas, variantes alélicas (por ejemplo, diferencias en un solo aminoácido) o isoformas de corte y empalme alternativo, que incluyen las composiciones y métodos para producir roedores que expresan tales polipéptidos a partir de un promotor humano y una(s) secuencia(s) reguladora(s) humana(s). En algunos casos, se describen composiciones y métodos para producir roedores que expresan tales polipéptidos a partir de un promotor endógeno de roedor y una(s) secuencia(s) reguladora(s) endógena(s) de roedor. Los métodos incluyen insertar el material genético que codifica un polipéptido PD-L1 humano (por ejemplo, una secuencia de ADN de *CD274* humano) en parte en un sitio preciso en el genoma de un roedor que corresponde a un gen de *CD274* endógeno para crear así un gen de *CD274* humanizado que expresa un polipéptido PD-L1 que es humano en parte. Alternativamente, la inserción del material genético que codifica un polipéptido PD-L1 humano en parte puede realizarse en un sitio aleatorio en el genoma de un roedor, es decir, fuera de un gen de *CD274* endógeno. En algunos casos, los métodos incluyen insertar ADN genómico correspondiente a los exones 3-5 (o los exones 3, 4 y una porción del exón 5) de un gen *CD274* humano en un gen de *CD274* endógeno del roedor para crear así un gen humanizado que codifica un polipéptido PD-L1 que contiene una porción humana que contiene aminoácidos codificados por los exones insertados.

Cuando corresponda, la región codificante del material genético o secuencia(s) de polinucleótido(s) que codifica(n) un polipéptido PD-L1 humano en parte pueden modificarse de manera que incluyan codones optimizados para la expresión en el roedor (por ejemplo, ver las patentes de Estados Unidos núm. 5,670,356 y 5,874,304). Las secuencias optimizadas por codones son secuencias sintéticas, y, preferentemente, codifican el polipéptido idéntico (o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de longitud completa que tiene sustancialmente la misma actividad que el polipéptido de longitud completa) codificado por el polinucleótido original no optimizado por codones. En algunas modalidades, la región codificante del material genético que codifica un polipéptido PD-L1 humano, en parte, puede incluir una secuencia alterada para optimizar el uso de codones en un tipo de célula particular (por ejemplo, una célula de roedor). Por ejemplo, los codones del ADN genómico correspondiente a los exones 3-5 (o los exones 3, 4 y una porción del exón 5) de un gen *CD274* humano a insertar en un gen de *CD274* endógeno de un roedor pueden optimizarse para su expresión en una célula del roedor. Tal secuencia puede describirse como una secuencia con codones optimizados.

Un enfoque del gen de *CD274* humanizado emplea una modificación relativamente mínima del gen endógeno y da como resultado la transducción natural de las señales mediadas por *CD274* (es decir, mediadas por PD-L1) en el roedor, debido, por ejemplo, a que la secuencia genómica del gen de *CD274* se encuentra modificada en un solo fragmento y por lo tanto conserva su funcionalidad normal mediante la inclusión de las secuencias reguladoras necesarias y, en algunas modalidades, de las secuencias intrónicas. Por lo tanto, en tales modalidades, la modificación del gen de *CD274* no afecta otros genes circundantes u otros genes endógenos que interactúan con *CD274* (por ejemplo, *Pdcd1*, etcétera). Además, en varias modalidades, la modificación no afecta el ensamblaje de un polipéptido transmembrana PD-L1 funcional en la membrana plasmática y mantiene sus funciones efectoras normales por medio de la unión y posterior transducción de señales a través de la porción citoplasmática del polipéptido que no se afecta por la modificación.

Una ilustración esquemática (que no está a escala) de la organización genómica de un gen *Cd274* de roedor (por ejemplo, de ratón) y un gen *CD274* humano se expone en la Figura 1. Los constructos ilustrativos para humanizar un gen *Cd274* endógeno de roedor (por ejemplo, de ratón) con el uso de un fragmento genómico que contiene los exones 3, 4 y una porción del exón 5 de un gen *CD274* humano se exponen en la Figura 2. Como se ilustra, el ADN genómico que contiene los exones 3, 4 y una porción del exón 5 de un gen *CD274* humano se inserta en un locus del gen *Cd274* endógeno de roedor (por ejemplo, de ratón) con un constructo de transformación. Este ADN genómico incluye la porción del gen que codifica una porción extracelular (por ejemplo, los residuos de aminoácidos 19-238) de un polipéptido PD-L1 humano. Si se desea, el ADN genómico que contiene los exones 3 y 4 de un gen *CD274* humano puede insertarse en un locus del gen *Cd274* endógeno de roedor (por ejemplo, de ratón) con un constructo de transformación para incluir la porción del gen que codifica los dominios V y C de inmunoglobulina (por ejemplo, los residuos de aminoácidos 19-227) de un polipéptido PD-L1 humano. Alternativamente, el ADN genómico que contiene solo el exón 3 de un gen *CD274* humano puede insertarse en un locus del gen *Cd274* endógeno de roedor (por ejemplo, de ratón) con un constructo de transformación para incluir solo la porción del gen que codifica el dominio V de inmunoglobulina (por ejemplo, los residuos de aminoácidos 19-131) de un polipéptido PD-L1 humano. Los expertos al leer esta descripción comprenderán que varias cantidades de material genético de un gen *CD274* humano pueden insertarse en el genoma de un roedor según la metodología descrita en la presente descripción en dependencia del polipéptido PD-L1 codificado que se desee.

Un roedor (por ejemplo, un ratón) que tiene un gen de *CD274* humanizado en el locus de *CD274* endógeno puede producirse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede producirse un vector de transformación que introduce un gen *CD274* humano en parte con un gen marcador de selección. La Figura 2 ilustra un locus *Cd274* endógeno de un genoma de ratón que comprende una inserción de los exones 3, 4 y una porción del exón 5 (alrededor de 32 pb) de un gen *CD274* humano. Como se ilustra, el constructo de transformación contiene un brazo de homología 5' que contiene la secuencia aguas arriba del exón 3 de un gen *Cd274* murino endógeno (~92,9 Kb), seguido de un fragmento de ADN genómico que contiene el exón 3 de un gen *CD274* humano (~4494 pb), un casete de selección con fármaco (por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina flanqueado en ambos lados por secuencias loxP; ~5 Kb) en dirección transcripcional opuesta con relación al gen *Cd274* murino endógeno, un fragmento de ADN genómico que contiene el exón 4 y una porción del exón 5 de un gen *CD274* humano (~3950 pb), y un brazo de homología 3' que contiene una porción del exón 5 de un gen *Cd274* murino endógeno y una secuencia genómica aguas abajo que incluye los exones 6 y 7 (~67,6 Kb). El constructo de transformación contiene un casete de selección con fármaco autoeliminable (por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina flanqueado por secuencias loxP; véanse las patentes de Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392 y 8,354,389).

Tras la recombinación homóloga, los exones 3, 4 y una porción del exón 5 de un gen *Cd274* murino endógeno se reemplazan por la secuencia contenida en el vector de transformación (es decir, los exones 3, 4 y una porción del exón 5 de un gen *CD274* humano) lo que da como resultado una delección de alrededor de 8964 pb. Se crea un gen de *CD274* humanizado lo que da como resultado una célula o roedor que expresa un polipéptido PD-L1 humanizado que contiene los aminoácidos codificados por el ADN genómico insertado de un gen de *CD274* humano). El casete de selección con fármaco se elimina de una manera dependiente del desarrollo, es decir, la progenie derivada de los ratones cuyas células de la línea germinal contienen el gen *CD274* humanizado descrito anteriormente liberarán el marcador de selección de las células diferenciadas durante el desarrollo.

Aunque las modalidades que emplean un gen de CD274 humanizado en un ratón (es decir, un ratón con un gen de CD274 que codifica un polipéptido PD-L1 que incluye una porción humana y una porción de ratón) se analizan exhaustivamente en la presente descripción, también se proporcionan otros roedores que comprenden un gen de CD274 humanizado. Tales roedores comprenden un gen de CD274 humanizado unido operativamente a un promotor endógeno de roedor. En algunas modalidades, tales roedores expresan un polipéptido PD-L1 humanizado a partir de un locus endógeno, en donde el polipéptido PD-L1 humanizado comprende los residuos de aminoácidos 19-238 (o 19-227 o 19-131) de un polipéptido PD-L1 humano. Tales roedores incluyen cualquiera de los que pueden modificarse genéticamente para expresar un polipéptido PD-L1 como se describe en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, ratón, rata, etcétera. Las secuencias ilustrativas de ortólogos de CD274 no humanos incluyen, por ejemplo, PD-L1 de pollo (XM_424811.3 y XP_424811.3), chimpancé (XM_001140705.2 y XP_001140705.1), PD-L1 de vaca (NM_001163412.1 y NP_001_156884.1) y PD-L1 de perro (XM_541302.3 y XP_541302.3), mono (NM_001083889.1 y NP_001077358.1) y rata (NM_001191954.1 y NP_001178883.1). Por ejemplo, para aquellos roedores para los que no se dispone fácilmente de células ES genéticamente modificables adecuadas, se emplean otros métodos para producir un roedor que comprende la modificación genética. Tales métodos incluyen, por ejemplo, la modificación de un genoma de células que no son ES (por ejemplo, un fibroblasto o una célula pluripotente inducida) y el empleo de transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) para transferir el genoma modificado genéticamente a una célula adecuada, por ejemplo, un ovocito enucleado, y la gestación de la célula modificada (por ejemplo, el ovocito modificado) en un roedor en condiciones adecuadas para formar un embrión (ver, por ejemplo, Wilmut, I. y otros, 1997, Nature 385:810-813; publicaciones de solicitud de patente internacional núm. WO 97/07668 y WO 97/07669).

Los métodos para modificar un genoma de roedor incluyen, por ejemplo, emplear una nucleasa con dedos de zinc (ZFN) o una nucleasa efectora de tipo activadora de la transcripción (TALEN) para modificar un genoma de manera que incluya un gen de CD274 humanizado.

También puede crearse un roedor que alberga un gen de CD274 humanizado como se describe en la presente descripción mediante la introducción aleatoria de una secuencia de ácido nucleico de CD274 en el genoma de un roedor como un transgén. En dependencia del contexto, se pueden emplear secuencias de CD274 genómicas o de ADNc humanas. Por ejemplo, las secuencias intrónicas y las señales de poliadenilación pueden incluirse en el transgén para aumentar la eficiencia y el nivel de expresión del transgén. Una(s) secuencia(s) reguladora(s) específica(s) de tejido puede(n) unirse operativamente a un transgén de CD274 para dirigir la expresión de un polipéptido PD-L1 a tipos de células particulares. Un promotor constitutivo puede unirse operativamente a la secuencia de ácido nucleico de CD274 de manera que el polipéptido PD-L1 codificado se sobreexpresa (es decir, se exprese a un nivel superior y/o en tejidos no observados en un roedor de tipo silvestre).

Un animal no humano fundador transgénico puede identificarse en base a la presencia de un transgén de CD274 en su genoma y/o la expresión del ARNm de PD-L1 en tejidos o células del animal roedor. Un roedor fundador transgénico puede usarse entonces para producir un roedor adicional que porta el transgén de CD274. Por otra parte, los roedores transgénicos que portan un transgén que codifica un polipéptido PD-L1 humano, en parte, pueden cruzarse después con otros roedores transgénicos que portan otros transgenes (por ejemplo, un transgén de *Pdcd1* o CD80).

También se pueden producir roedores transgénicos de modo que contengan sistemas seleccionados que permitan la expresión regulada o dirigida del transgén. Los sistemas ilustrativos incluyen el sistema de recombinasa *Cre/loxP* del bacteriófago P1 (ver, por ejemplo, Lakso, M. y otros, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236) y el sistema de recombinasa FLP/Frt de *S. cerevisiae* (O'Gorman, S. y otros, 1991, Science 251:1351-1355). Tales animales pueden proporcionarse mediante la construcción de roedores transgénicos "dobles", por ejemplo, mediante el apareamiento de dos roedores transgénicos, uno que contiene un transgén que codifica un polipéptido seleccionado (por ejemplo, un transgén de CD274) y el otro que contiene un transgén que codifica una recombinasa (por ejemplo, una recombinasa Cre).

Los roedores de la presente invención, como se define en las reivindicaciones, pueden prepararse como se describió anteriormente, o mediante el uso de los métodos conocidos en la técnica, de modo que comprendan genes humanos o humanizados adicionales, a menudo en dependencia del uso previsto del roedor. El material genético de tales genes humanos o humanizados adicionales puede introducirse a través de la alteración adicional del genoma de las células (por ejemplo, células madre embrionarias) que tienen las modificaciones genéticas como se describió anteriormente o a través de técnicas de mejoramiento conocidas en la técnica con otras cepas modificadas genéticamente como se desee. En algunas modalidades, los roedores de la presente invención se preparan de modo que comprendan uno o más genes humanos o humanizados seleccionados de la familia de ligandos B7 y/o la familia de receptores CD28. En algunos casos, los roedores de la presente invención pueden prepararse mediante la introducción de un vector de transformación, como se describe en la presente descripción, en una célula de una cepa modificada. Como se expone en las reivindicaciones, los roedores de la presente invención comprenden un gen de muerte celular programada 1 (*Pdcd1*) humanizado. En algunas modalidades, los roedores de la presente invención comprenden un gen de CD274 humanizado, como se describe en la presente descripción, y material genético de una especie heteróloga (es decir, seres humanos), en donde el material genético codifica, en parte, uno o más polipéptidos heterólogos seleccionados de la familia de ligandos B-7 o de la familia de receptores CD28. Los roedores de la presente invención comprenden un gen de CD274 humanizado como se describe en la presente descripción y material genético de una especie

heteróloga (es decir, seres humanos), en donde el material genético codifica, en parte, un polipéptido PD-1 heterólogo (es decir, humano). Como se expone en las reivindicaciones, los roedores de la presente invención comprenden un gen de Pdccl que comprende una porción endógena y una porción humana, en donde la porción humana codifica el dominio extracelular de un polipéptido PD-1 humano y la porción endógena codifica el dominio intracelular de un polipéptido PD-1 endógeno; en algunas modalidades, las porciones humana y endógena están unidas operativamente a un promotor de Pdccl endógeno de roedor.

Por ejemplo, como se describe en la presente descripción, los roedores que comprenden un gen de CD274 humanizado pueden comprender, además, (por ejemplo, por medio de cruzamiento o estrategias de transformación de múltiples genes) una o más modificaciones como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 14/744,592, presentada el 19 de junio de 2015. En ciertas modalidades, un roedor que comprende un gen de CD274 humanizado (es decir, el exón 3, 4 y una porción 5' del exón 5 de un gen de CD274 humano unidos operativamente a los exones 1, 2, una porción 3' del exón 5, el exón 6 y el exón 7 de un gen de Cd274 endógeno de roedor de manera que el gen de CD274 humanizado codifica un polipéptido PD-L1 que tiene una porción extracelular de un polipéptido PD-L1 humano y una porción intracelular de un polipéptido PD-L1 de roedor) se cruza con un roedor que comprende un gen de Pdccl humanizado (por ejemplo, el exón 2 y una porción 5' del exón 3 de un gen de PDCD1 humano unidos operativamente al exón 1, una porción 3' del exón 3, el exón 4 y el exón 5 de un gen de Pdccl endógeno de roedor de manera que el gen de Pdccl humanizado codifica un polipéptido PD-1 que tiene una porción extracelular de un polipéptido PD-1 humano y una porción intracelular de un polipéptido PD-1 de roedor; ver, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 14/744,592, presentada el 19 de junio de 2015). En algunas modalidades, un gen de Pdccl humanizado comprende los exones 1, 4 y 5 de Pdccl de roedor, un exón 2 de Pdccl humano y un exón 3 de Pdccl, cuyo exón 3 de Pdccl comprende una porción humana y una porción de roedor, y en donde dichos exones de roedor y humanos se unen operativamente. En algunas modalidades, una porción humana de un exón 3 de Pdccl1 incluye nucleótidos que codifican una secuencia de tallo de PD-1. En algunas modalidades, una porción humana de un exón 3 de Pdccl incluye alrededor de 71 pb de un exón 3 de Pdccl humano. En algunas modalidades, una porción de roedor de un exón 3 de Pdccl1 incluye nucleótidos que codifican una secuencia transmembrana. En algunas modalidades, una porción de roedor de un exón 3 de Pdccl1 incluye alrededor de 91 pb de un exón 3 de Pdccl1 de roedor. En modalidades específicas, un gen de Pdccl1 humanizado codifica un polipéptido PD-1 humanizado que incluye una porción extracelular (por ejemplo, sustancialmente el dominio extracelular completo) de un polipéptido PD-1 humano, una porción transmembrana (por ejemplo, sustancialmente el dominio transmembrana completo) y una porción intracelular (por ejemplo, (por ejemplo, sustancialmente el dominio intracelular completo) de un polipéptido PD-1 de roedor.

El animal modificado genéticamente de la presente invención es un roedor. En algunas modalidades, un roedor de la presente invención se selecciona de un ratón, una rata y un hámster. En algunas modalidades, un roedor de la presente invención se selecciona de la superfamilia Muroidea. En algunas modalidades, un roedor modificado genéticamente de la presente invención es de una familia seleccionada de Calomyscidae (por ejemplo, hámsteres tipo ratón), Cricetidae (por ejemplo, hámster, ratas y ratones del Nuevo Mundo, ratones campestres), Muridae (ratones y ratas verdaderos, jerbos, ratones espinosos, ratas crestadas), Nesomyidae (ratones trepadores, ratones de roca, ratas coliblanco, ratas y ratones de Madagascar), Platacanthomyidae (por ejemplo, lirones espinosos) y Spalacidae (por ejemplo, ratas topo, ratas de bambú y zokores). En algunas modalidades determinadas, un roedor modificado genéticamente de la presente invención se selecciona de un ratón o rata verdaderos (familia Muridae), un jerbo, un ratón espinoso y una rata crestada. En algunas modalidades determinadas, un ratón modificado genéticamente de la presente invención es un miembro de la familia Muridae. El animal no humano de la presente invención es un roedor. En algunas modalidades determinadas, un roedor de la presente invención se selecciona de un ratón y una rata. En algunas modalidades, un roedor de la presente invención es un ratón.

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

En algunas modalidades, un roedor de la presente invención es una rata. En algunas modalidades determinadas, una rata de la presente invención, se selecciona de una rata Wistar, una cepa LEA, una cepa Sprague Dawley, una cepa Fischer, F344, F6 y Dark Agouti. En algunas modalidades determinadas, una cepa de rata como se describe en la presente descripción, es una mezcla de dos o más cepas seleccionadas del grupo que consiste en Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6 y Dark Agouti.

Métodos que emplean roedores que tienen genes CD274 humanizados

Se ha informado acerca de células y animales no humanos (por ejemplo, ratones) transgénicos y mutantes para CD274 (Iwai, Y. y otros, 2002, Proc. Nat. Acad. Sci. 99(19):12293-12297; Latchman, Y. E. y otros, 2004, Proc. Nat. Acad. Sci. 101 (29): 10691-10696; Subudhi, S. K. y otros, 2004, J. Clin. Invest. 113(5):694-700; Guleria, I. y otros, 2005, J. Exp. Med. 202(2):231-237; Keir, M.E. y otros, 2006, J. Exp. Med. 203(4):883-895; Tanaka, K. y otros, 2007, J. Immunol. 179:5204-5210; Wang, C. y otros, 2008, Diabetes 57:1861-1869; Wen, X. y otros, 2008, Transplant. 86(11):1596-1602; Plege, A. y otros, 2009, Transpl. 87(7):975-982; Cao, Y. y otros, 2010, Cancer Res. 71 (4):1235-1243; Plege, A. y otros, 2010, Eur. Soc. Organ Transplant. 23:1293-1300; Ritprajak, P. y otros, 2010, J. Immunol. 184:4918-4925; Yantha, J. y otros, 2010, Diabetes 59:2588-2596; Ding, Q. y otros, 2011, J. Leukocyte Biol. 90:77-86; Tang, L. y otros, 2011, Xi Bao Yu FenZi Mian Yi Xue Za Zhi 27(4) :357-359; Ghazizadeh, S. y otros, 2012, 20(1):196-203). Tales animales mutantes y transgénicos han sido útiles para determinar los aspectos moleculares de la expresión y función de PD-L1, y el papel de la vía PD-1:PD-L1 en la regulación de las respuestas inmunitarias, en particular, las respuestas de células T. Sin embargo, han venido con limitaciones que se basan, en parte, en la variabilidad demostrada en los resultados obtenidos. Muchos animales transgénicos para PD-L1 han empleado el uso de transgenes diseñados para sobreexpresar PD-L1 endógeno (ver, por ejemplo, Ghazizadeh y otros, supra), mientras que otros se han enfocado en vincular la expresión de PD-L1 transgénico con promotores específicos de tejido (ver, por ejemplo, Ritprajak y otros, supra). Algunos de estos animales han mostrado patrones de expresión de PD-L1 transgénico que no se correlacionan con los perfiles de transcripción de tipo silvestre (ver, por ejemplo, Wang y otros y Yantha y otros, supra). Además, debido al uso del mismo material genético fuente (por ejemplo, el transgén de PD-L1 de ratón en un ratón), la sobreexpresión de PD-L1 puede haber correspondido al PD-L1 endógeno en lugar del PD-L1 transgénico debido a posibles efectos de la posición del transgén. En algunos casos, tales animales han demostrado un desarrollo acelerado de la enfermedad y, por lo tanto, plantean la preocupación de que el transgén posiblemente pueda haber creado o modificado uno o más fenotipos, lo que complica así el análisis de la función de PD-L1. Estos resultados pueden atribuirse razonablemente al diseño del constructo. En el contexto del PD-L1 humano, las células endoteliales intestinales de cerdo modificadas genéticamente para expresar de manera estable un PD-L1 humano controlado por CMV se han empleado en un modelo de trasplante de piel de cerdo en miniatura y proporcionaron importantes conocimientos sobre la expresión ectópica de PD-L1 humano en un modelo de aloinjerto. (Ding y otros, supra). Los animales no humanos transgénicos para PD-L1 existentes han demostrado ser útiles para dilucidar alguna función biológica de PD-L1 y de la vía PD-1 :PD-L1, sin embargo, como se demostró anteriormente, los sistemas *in vivo* actuales que explotan la biología mediada por PD-L1 están incompletos. Los aspectos moleculares de la vía PD-1:PD-L1 y su papel en la regulación de las respuestas inmunitarias en el contexto del cáncer y la autoinmunidad no se han explotado en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) a su máximo potencial.

Los roedores de la presente invención, como se define en las reivindicaciones, proporcionan un sistema *in vivo* mejorado y una fuente de materiales biológicos (por ejemplo, células) que expresan PD-L1 humano que son útiles para una variedad de ensayos. En un ejemplo, los roedores de la presente invención pueden usarse para desarrollar agentes terapéuticos dirigidos a PD-L1 y/o que modulan la señalización de PD-1 :PD-L1 (por ejemplo, que interfieren con las interacciones con PD-1) y/o que modulan las interacciones de PD-L1 con otras parejas de unión (por ejemplo, B7-1). Tales animales son particularmente útiles ya que son completamente inmunocompetentes a diferencia de muchos otros modelos animales usados para estudios *in vivo*; por lo tanto, el análisis del efecto de las terapias no se complica por un estado inmunocomprometido. En un ejemplo, los roedores de la presente invención pueden usarse para identificar, cribar y/o desarrollar agentes terapéuticos candidatos (por ejemplo, anticuerpos) que se unen a PD-L1 humano. En un ejemplo, los roedores de la presente invención pueden usarse para cribar y desarrollar agentes terapéuticos candidatos (por ejemplo, anticuerpos) que bloquean la interacción de PD-L1 humano con PD-1 humano y/o B7-1 humano. En un ejemplo, los roedores de la presente invención pueden usarse para determinar el perfil de unión de antagonistas y/o agonistas de un polipéptido PD-L1 humanizado en la superficie de una célula de un roedor como se describe en la presente descripción; por ejemplo, de la presente invención pueden usarse para determinar el epítipo o epítopos de uno o más anticuerpos terapéuticos candidatos que se unen a PD-L1 humano.

En varias modalidades, los roedores de la presente invención se usan para determinar los perfiles farmacocinéticos de los anticuerpos anti-PD-L1. En varias modalidades, uno o más roedores de la presente invención y uno o más roedores de control o de referencia se exponen cada uno a uno o más anticuerpos terapéuticos candidatos anti-PD-L1 a varias dosis (por ejemplo, 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/mg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, o 50 mg/kg o más). Los anticuerpos terapéuticos candidatos pueden dosificarse por medio de cualquier vía de administración deseada que incluye las vías de administración parenteral y no parenteral. Las rutas parenterales incluyen, por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intraportal, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intraespinal, intratecal, intracerebroventricular, intracraneal, intrapleural u otras rutas de inyección. Las vías no parenterales incluyen, por ejemplo, oral, nasal, transdérmica, pulmonar, rectal, bucal, vaginal, ocular. La administración también puede ser mediante infusión continua, administración local, liberación sostenida a partir de implantes (geles, membranas o similares), y/o inyección intravenosa. La sangre se aísla de los roedores (humanizados y de control) en varios puntos de tiempo (por ejemplo, 0 h, 6 h, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, o hasta 30 o más días). Se puede realizar varios ensayos para determinar los perfiles farmacocinéticos de los anticuerpos terapéuticos candidatos administrados mediante el uso de muestras obtenidas a partir de roedores como se describe en la presente

descripción, que incluyen, pero sin limitarse a, IgG total, respuesta contra el anticuerpo terapéutico, aglutinación, etc.

En un ejemplo, los roedores de la presente invención pueden usarse para medir el efecto terapéutico de bloquear o modular la señalización de PD-L1 (o señalización PD-1:PD-L1, o interacciones mediadas por PD-L1:B7-1) y el efecto sobre expresión génica como resultado de cambios celulares. En un ejemplo, un animal no humano de la presente invención o células aisladas a partir de este se exponen a un agente terapéutico candidato que se une a un polipéptido PD-L1 humanizado (o una porción humana de un polipéptido PD-L1) en la superficie de una célula del roedor y, después de un período de tiempo posterior, se analizan para determinar los efectos sobre los procesos (o interacciones) dependientes de PD-L1, por ejemplo, adhesión, apoptosis, producción de citocinas, inflamación, proliferación, tolerancia a lo propio e infección viral (o respuestas).

Los roedores de la presente invención expresan el polipéptido PD-L1 humanizado, por lo tanto, pueden generarse células, líneas celulares y cultivos celulares que sirven como fuente de PD-L1 humanizado para su uso en ensayos funcionales y de unión, por ejemplo, para el ensayo de la unión o función de un antagonista o agonista de PD-L1, particularmente cuando el antagonista o agonista es específico para una secuencia o epítipo de PD-L1 humano o, alternativamente, específico para una secuencia o epítipo de PD-L1 humano que se asocia con PD-1 y/o B7-1. En varios casos, los epítopos de PD-L1 unidos a los anticuerpos terapéuticos candidatos pueden determinarse mediante el uso de células aisladas de roedores de la presente invención.

Un polipéptido PD-L1 humanizado expresado por un roedor como se describe en la presente descripción puede comprender una variante de secuencia de aminoácidos. Las variantes del polipéptido PD-L1 humano ilustrativas incluyen las enumeradas en la página web SNP GeneView del NCBI y se resumen en la Tabla 3. En varias modalidades, los roedores de la presente invención expresan una variante del polipéptido PD-L1 humanizado. En varias modalidades, la variante es polimórfica en una posición de aminoácido asociada con la unión al ligando. Los roedores de la presente invención pueden usarse para determinar el efecto de la unión al ligando mediante la interacción con una variante polimórfica del polipéptido PD-L1 humano. En algunas modalidades determinadas, los roedores de la presente invención expresan una variante del polipéptido PD-L1 humano que aparece en la Tabla 3.

Tabla 3

Posición en cromosoma	Posición en ARNm	Núm. ID de Variante	Alelo	Aminoácido	Posición del codón	Posición del aminoácido
5456116	111	rs111401207	A	I	3	1
			G	M	3	1
5456126	121	rs139709512	C	P	1	5
			G	A	1	5
5456128	123	rs577786663	C	A	3	5
			T	A	3	5
5456131	126	rs545701711	G	V	3	6
			C	V	3	6
5462841	168	rs561746087	T	Y	3	20
			C	Y	3	20
5462844	171	rs138119378	T	N	3	21
			C	N	3	21
5462876	203	rs17718883	G	R	2	32
			C	P	2	32
5462881	208	rs140045210	T	S	1	34
			A	T	1	34
5462893	220	rs367921713	A	K	1	38
			G	E	1	38
5462919	246	rs565831052	T	Y	3	46
			C	Y	3	46
5462929	256	rs146495642	A	K	1	50
			G	E	1	50
5462931	258	rs181557130	G	E	3	50
			A	E	3	50
5462952	279	rs201730760	T	D	3	57
			C	D	3	57
5462964	291	rs569746752	A	L	3	61
			G	L	3	61
5462979	306	rs200229222	T	T	3	66
			C	T	3	66

	5462984	311	rs555485716	T	I	2	68
				C	T	2	68
	(continuación)						
5	Posición en cromosoma	Posición en ARNm	Núm. ID de Variante	Alelo	Aminoácido	Posición del codón	Posición del aminoácido
	5462988	315	rs199878088	C	N	3	69
				T	N	3	69
	5462997	324	rs41280721	C	S	3	72
10				A	R	3	72
	5463108	435	rs376339401	G	E	3	109
				A	E	3	109
	5465514	464	rs61752860	T	L	2	119
15				A	H	2	119
	5465530	480	rs372727420	A	R	3	124
				G	R	3	124
	5465594	544	rs568608390	T	C	1	146
				C	R	1	146
20	5465595	545	rs148141792	A	H	2	146
				G	R	2	146
	5466785	572	rs141978642	A	E	2	155
				T	V	2	155
25	5467847	624	rs150697452	C	H	3	172
				T	H	3	172
	5467858	635	rs369350813	T	M	2	176
				C	T	2	176
30	5467859	636	rs373167098	A	T	3	176
				G	T	3	176

Las células de los roedores de la presente invención pueden aislarse y usarse sobre una base ad hoc, o pueden mantenerse en cultivo por muchas generaciones. En varios casos, las células de un roedor de la presente invención se immortalizan (por ejemplo, por medio del uso de un virus) y se mantienen en cultivo indefinidamente (por ejemplo, en cultivos en serie).

En varios casos, las células y/o roedores descritos en la presente descripción de la presente invención se usan en varios regímenes de inmunización para determinar las funciones mediadas por PD-L1 en la respuesta inmunitaria a un antígeno (por ejemplo, una respuesta de células T). En algunos casos, los agentes terapéuticos candidatos que se unen, o bloquean, una o más funciones de PD-L1 humano (o humanizado) se caracterizan en un roedor de la presente invención. Las mediciones adecuadas incluyen varios ensayos celulares, ensayos de proliferación, análisis de inmunoglobulinas séricas (por ejemplo, titulación de anticuerpos), ensayos de citotoxicidad, caracterización de interacciones entre ligando y receptor (por ejemplo, ensayos de inmunoprecipitación) y caracterización de interacciones entre ligandos. En algunos casos, los roedores de la presente invención se usan para caracterizar las funciones mediadas por PD-L1 que regulan una respuesta inmunitaria a un antígeno. En algunos casos, el antígeno se asocia con una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria. En algunos casos, el antígeno se asocia con una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria. En algunos casos, ese antígeno se asocia con una neoplasia. En algunos casos, el antígeno se asocia con un agente infeccioso (por ejemplo, una bacteria). En algunos casos, el antígeno es un antígeno de prueba (por ejemplo, ovoalbúmina u OVA). En algunos casos, el antígeno es una diana asociada con una enfermedad o afección que padecen uno o más pacientes humanos que necesitan tratamiento.

Los roedores de la presente invención pueden usarse en ensayos séricos para determinar los títulos de producción de autoanticuerpos para evaluar los aspectos farmacotológicos de los agentes terapéuticos candidatos dirigidos a PD-L1 humano. En algunos casos, la producción de autoanticuerpos en roedores de la presente invención es el resultado de una o más enfermedades, trastornos o afecciones autoinmunitarias inducidas en el roedor.

Los roedores de la presente invención pueden usarse para el reto con uno o más antígenos para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de PD-L1 de una respuesta inmunitaria, que incluye pero sin limitarse a, las respuestas dependientes de células T y dependientes de células B específicas a un antígeno dado.

Las células descritas en la presente descripción y/o los roedores de la presente invención pueden usarse en un ensayo de supervivencia y/o proliferación (por ejemplo, que emplean células B o T) para cribar y desarrollar agentes terapéuticos candidatos que modulan la señalización de PD-L1 humano. La activación o la inhibición de PD-L1 desempeña un papel importante en la regulación de las respuestas de células T, y la regulación de la tolerancia a lo

propio por PD-L1 puede ser el resultado de la activación de epítomos específicos del dominio extracelular de PD-L1, por lo tanto, los moduladores de PD-L1 candidatos (por ejemplo, antagonistas o agonistas) pueden identificarse, caracterizarse y desarrollarse mediante el uso de células de roedores de la presente invención y/o un roedor como se describe en la presente descripción. Las células descritas en la presente descripción y/o los roedores de la presente invención pueden usarse en ensayo(s) de supervivencia o muerte para determinar el efecto sobre la proliferación o la apoptosis de célula(s) específica(s) (por ejemplo, células cancerosas) en presencia y ausencia de PD-L1.

Las células descritas en la presente descripción y/o los roedores de la presente invención pueden usarse en el xenotrasplante de células o tejido heterólogos (por ejemplo, humanos) para determinar las funciones mediadas por PD-L1 en la respuesta fisiológica (por ejemplo, inmunitaria) a las células o el tejido humanos trasplantados. En algunos ejemplos, los agentes terapéuticos candidatos que se unen, o bloquean, una o más funciones de PD-L1 humano se caracterizan en un roedor de la presente invención. Las mediciones adecuadas incluyen varios ensayos celulares, ensayos de proliferación, análisis de inmunoglobulinas séricas (por ejemplo, titulación de anticuerpos), ensayos de citotoxicidad, y caracterización de las interacciones ligando-receptor (ensayos de inmunoprecipitación). En algunos ejemplos, los roedores de la presente invención se usan para caracterizar las funciones mediadas por PD-L1 que regulan una respuesta inmunitaria a un antígeno. En algunos ejemplos, el antígeno se asocia con una neoplasia. En algunos ejemplos, el antígeno se asocia con una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria. En algunos ejemplos, el antígeno se asocia con una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria. En algunos ejemplos, el antígeno es una diana asociada con una enfermedad o afección que padecen uno o más pacientes humanos que necesitan tratamiento.

En varios ejemplos, los roedores de la presente invención se usan en experimentos de trasplante o transferencia adoptiva para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de PD-L1 de linfocitos xenogénicos y su función inmunitaria. En varios ejemplos, se trasplantan células T humanas a los roedores de la presente invención; en algunos ejemplos, células T vírgenes; en algunos ejemplos, células T activadas.

En varios ejemplos, las células de los roedores de la presente invención se usan en ensayos de células T para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de PD-L1 de la respuesta y función dependientes de células T. Los ensayos de células T ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, ELISpot, tinción de citocinas intracelulares, restricción del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), ensayos de supresión viral, ensayos de citotoxicidad, ensayos de proliferación y ensayos de supresión de células T reguladoras.

En varios ejemplos, las células de los roedores de la presente invención se usan en ensayos de trans migración de células para cribar y desarrollar agentes terapéuticos candidatos que modulan al PD-L1 humano. La trans migración de células involucra la migración de células a través del endotelio y los ensayos de trans migración permiten la medición de interacciones con el endotelio, y la trans migración de este, por leucocitos o células tumorales.

En varios ejemplos, las células de los roedores de la presente invención se usan en ensayos de crecimiento (o proliferación) de células tumorales para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación y/o la apoptosis de células tumorales dependiente de PD-L1.

En varios ejemplos, las células de los roedores de la presente invención se usan en ensayos de producción de citocinas para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de PD-L1 de la liberación de citocinas de las células T (por ejemplo, interferón- γ , interleucina-10). En algunos ejemplos, las células de los roedores de la presente invención se usan para la detección (y/o medición) de la liberación de citocinas intracelulares como resultado de la interacción de PD-L1 humanizado con un fármaco dirigido a PD-L1 humano o una pareja de unión de PD-L1 (por ejemplo, PD-1, B7-1 o una versión soluble de estos).

En varios ejemplos, una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria se inducen en uno o más roedores de la presente invención para proporcionar un sistema *in vivo* para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de PD-L1 de una o más funciones (o aspectos) de la enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria. Las enfermedades, trastornos o afecciones autoinmunitarias ilustrativas que pueden inducirse en uno o más animales no humanos de la presente invención incluyen diabetes, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (por ejemplo, un modelo de esclerosis múltiple), artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.

Los roedores de la presente invención proporcionan un sistema *in vivo* para el análisis y prueba de un fármaco o vacuna. En varios casos, un fármaco o vacuna candidata puede suministrarse a uno o más roedores de la presente invención, seguido de la monitorización de los roedores para determinar una o más de la respuesta inmunitaria al fármaco o vacuna, el perfil de seguridad del fármaco o vacuna, o el efecto sobre una enfermedad o afección y/o uno o más síntomas de una enfermedad o afección. En algunos casos, la vacuna se dirige a un virus tal como, por ejemplo, el virus de la inmunodeficiencia humana o el virus de la hepatitis (por ejemplo, HCV). Los métodos ilustrativos usados para determinar el perfil de seguridad incluyen mediciones de toxicidad, concentración de dosis óptima, eficacia del fármaco o vacuna, y posibles factores de riesgo. Tales fármacos o vacunas pueden mejorarse y/o desarrollarse en

estos roedores.

Los roedores de la presente invención proporcionan un sistema *in vivo* mejorado para dilucidar los mecanismos de interacción entre células humanas mediante transferencia adoptiva. En varios casos, un xenoinjerto de tumor puede implantarse a los roedores de la presente invención, seguido de una segunda implantación de linfocitos infiltrantes de tumor que podrían implantarse en los roedores mediante transferencia adoptiva para determinar la eficacia en la erradicación de tumores sólidos u otras neoplasias malignas. Tales experimentos pueden realizarse con células humanas debido a la presencia exclusiva de PD-L1 humano sin competencia con PD-L1 endógeno de los roedores. Además, en tales roedores pueden mejorarse y/o desarrollarse terapias y productos farmacéuticos para su uso en xenotrasplantes.

Los roedores de la presente invención proporcionan un sistema *in vivo* para evaluar las propiedades farmacocinéticas de un fármaco dirigido a PD-L1 humano. En varias modalidades, un fármaco dirigido a PD-L1 humano puede suministrarse o administrarse a uno o más roedores de la presente invención, seguido de la monitorización de, o la realización de uno o más ensayos en, los roedores (o células aisladas a partir de estos), para determinar el efecto del fármaco sobre el no roedor. Las propiedades farmacocinéticas incluyen, pero no se limitan a, la manera en que un animal procesa el fármaco hacia varios metabolitos (o detección de la presencia o ausencia de uno o más metabolitos del fármaco, que incluyen, pero no se limitan a, metabolitos tóxicos), tiempo de vida media del fármaco, niveles circulantes del fármaco después de su administración (por ejemplo, concentración sérica del fármaco), respuesta contra el fármaco (por ejemplo, anticuerpos contra el fármaco), absorción y distribución del fármaco, ruta de administración, rutas de excreción y/o eliminación del fármaco. En algunas modalidades, las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los fármacos (por ejemplo, moduladores de PD-L1) se monitorizan en o mediante el uso de roedores de la presente invención.

Los roedores de la presente invención proporcionan un sistema *in vivo* para evaluar la toxicidad por unión a la diana de un fármaco dirigido a PD-L1 humano. Por ejemplo, un fármaco dirigido a PD-L1 humano puede suministrarse o administrarse a uno o más roedores de la presente invención, seguido de la monitorización de, o la realización de uno o más ensayos en, los roedores (o células aisladas a partir de estos) para determinar el efecto tóxico por unión a la diana del fármaco sobre el roedor. Típicamente, los fármacos se destinan a modular una o más funciones de sus dianas. Para proporcionar un ejemplo, un modulador PD-L1 está destinado a modular las funciones mediadas por PD-L1 (por ejemplo, la señalización de PD-L1 y/o las interacciones de PD-L1) mediante la interacción de alguna manera con la molécula de PD-L1 en la superficie de una o más células y, en algunas modalidades, el bloqueo de las interacciones con una o más parejas de unión de PD-L1. En algunos casos, un modulador de este tipo puede tener un efecto adverso que es una exageración de la(s) acción(es) farmacológica(s) deseada(s) del modulador. Tales efectos se denominan efectos por unión a la diana. Los efectos por unión a la diana ilustrativos incluyen una dosis demasiado elevada, activación/inactivación crónica, y acción correcta en un tejido incorrecto. En algunos casos, los efectos por unión a la diana de un fármaco dirigido a PD-L1 identificados en o mediante el uso de los roedores de la presente invención, se usan para determinar una(s) función(ones) de PD-L1 previamente desconocida(s).

Los roedores de la presente invención pueden proporcionar un sistema *in vivo* para evaluar la toxicidad por unión fuera de la diana de un fármaco dirigido a PD-L1 humano. Por ejemplo, un fármaco dirigido a PD-L1 humano puede suministrarse o administrarse a uno o más roedores de la presente invención, seguido de la monitorización de los roedores (o células aisladas a partir de estos), o la realización de uno o más ensayos en estos, para determinar el efecto tóxico por unión fuera de la diana del fármaco sobre el roedor. Los efectos por unión fuera de la diana pueden producirse cuando un fármaco interactúa con una diana no prevista (por ejemplo, reactividad cruzada a un epítipo común). Tales interacciones pueden producirse en un tejido previsto o no previsto. Para proporcionar un ejemplo, los isómeros especulares (enantiómeros) de un fármaco pueden conducir a efectos tóxicos por unión fuera de la diana. Además, un fármaco puede interactuar de manera inadecuada con diferentes subtipos de receptores y activarlos de manera no intencional. Los efectos por unión fuera de la diana ilustrativos incluyen la activación/inhibición incorrecta de una diana incorrecta independientemente del tejido en el que se encuentra la diana incorrecta. En algunos casos, los efectos por unión fuera de la diana de un fármaco dirigido a PD-L1 humano se determinan mediante la comparación de los efectos de la administración del fármaco a roedores de la presente invención con uno o más roedores de referencia.

En algunas modalidades, la realización de un ensayo incluye determinar el efecto sobre el fenotipo y/o el genotipo del animal no humano al que se administra el fármaco. En algunas modalidades, la realización de un ensayo incluye determinar la variabilidad lote a lote de un modulador de PD-L1 (por ejemplo, un antagonista o un agonista) o de un fármaco dirigido a PD-L1. En algunas modalidades, la realización de un ensayo incluye determinar las diferencias entre los efectos de un fármaco dirigido a PD-L1 administrado a un roedor de la presente invención y a un roedor de referencia. En varias modalidades, los roedores de referencia pueden tener una modificación como se describe en la presente descripción, una modificación que es diferente a como se describe en la presente descripción (por ejemplo, uno que tiene un gen de CD274 alterado, interrumpido, eliminado, insertado, modificado, etcétera, o no funcional de cualquier otra manera) o sin modificación (es decir, un roedor de tipo silvestre).

Los parámetros ilustrativos que pueden medirse en roedores (o en y/o mediante el uso de células aisladas a partir de estos) para evaluar las propiedades farmacocinéticas, la toxicidad por unión a la diana, y/o la toxicidad por unión fuera

de la diana de un fármaco dirigido a PD-L1 humano incluyen, pero no se limitan a, aglutinación, autofagia, división celular, muerte celular, hemólisis mediada por complemento, integridad del ADN, título de anticuerpos específicos para el fármaco, metabolismo del fármaco, matrices de expresión génica, actividad metabólica, actividad mitocondrial, estrés oxidativo, fagocitosis, biosíntesis de proteínas, degradación de proteínas, secreción de proteínas, respuesta al estrés, concentración del fármaco en el tejido diana, concentración del fármaco en tejido que no es diana, actividad transcripcional y similares. En varias modalidades, los roedores de la presente invención se usan para determinar una dosis farmacéuticamente eficaz de un modulador de PD-L1 (por ejemplo, un fármaco dirigido a PD-L1).

Los roedores de la presente invención pueden proporcionar un sistema *in vivo* mejorado para el desarrollo y caracterización de agentes terapéuticos candidatos para su uso en el cáncer. En varios casos, puede implantarse un tumor (o células tumorales) en los roedores de la presente invención, seguido de la administración de uno o más agentes terapéuticos candidatos. En algunos casos, los agentes terapéuticos candidatos pueden incluir un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) o un cóctel de anticuerpos; en algunas modalidades, los agentes terapéuticos candidatos incluyen una terapia combinada tal como, por ejemplo, la administración de dos o más anticuerpos monoespecíficos dosificados de manera secuencial o simultánea. El tumor puede dejarse durante el tiempo suficiente para su establecimiento en uno o más sitios dentro del roedor antes de la administración de uno o más agentes terapéuticos candidatos. La proliferación, crecimiento, supervivencia, etc., de las células tumorales puede medirse antes y después de la administración con el o los agentes terapéuticos candidatos. La citotoxicidad de los agentes terapéuticos candidatos puede medirse, además, en el roedor según convenga.

Los roedores de la presente invención pueden proporcionar un sistema *in vivo* mejorado para el desarrollo y caracterización de agentes terapéuticos candidatos para su uso en enfermedades infecciosas. En varios casos, los roedores de la presente invención pueden infectarse mediante la inyección con un virus (por ejemplo, MHV, HIV, HCV, etcétera) o patógeno (por ejemplo, bacterias), seguido de la administración de uno o más agentes terapéuticos candidatos. En algunos casos, los agentes terapéuticos candidatos pueden incluir un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) o un cóctel de anticuerpos; en algunos casos, los agentes terapéuticos candidatos incluyen una terapia combinada tal como, por ejemplo, la administración de dos o más anticuerpos monoespecíficos dosificados de manera secuencial o simultánea; en algunos casos, los agentes terapéuticos candidatos pueden incluir una vacuna. El virus o patógeno puede dejarse durante el tiempo suficiente para su establecimiento en uno o más sitios o células dentro del roedor de manera que se desarrollen uno o más síntomas asociados con la infección del virus o patógeno en el roedor. La proliferación y el crecimiento de células T puede medirse antes y después de la administración con el o los candidatos terapéuticos. Además, puede medirse la supervivencia, el análisis de citocinas séricas y/o intracelulares, la histopatología del hígado y/o el bazo en roedores infectados con el virus o patógeno. En algunos casos, los roedores de la presente invención se usan para determinar la extensión del daño a los órganos asociado con la infección viral. En algunos casos, los roedores de la presente invención se usan para determinar el perfil de expresión de citocinas y/o el perfil de expresión génica en varios órganos de roedores infectados con un virus particular.

Los roedores de la presente invención pueden emplearse para evaluar la eficacia de un fármaco terapéutico dirigido a células humanas. En varios casos, uno o más de la presente invención se trasplanta con células humanas y se administra un fármaco candidato dirigido a tales células humanas a dicho roedor. Después se determina la eficacia terapéutica del fármaco mediante la monitorización de las células humanas en el roedor después de la administración del fármaco. Los fármacos que pueden evaluarse en los roedores incluyen compuestos de molécula pequeña, es decir, compuestos de pesos moleculares menores que 1500 kD, 1200 kD, 1000 kD u 800 Daltons, y compuestos moleculares grandes (tales como proteínas, por ejemplo, anticuerpos), que tienen efectos terapéuticos previstos para el tratamiento de enfermedades y afecciones humanas al dirigirse a células humanas (por ejemplo, unión a ellas y/o acción sobre ellas).

En algunos casos, el fármaco es un fármaco contra el cáncer, y las células humanas son células cancerosas, que pueden ser células de un cáncer primario o células de líneas celulares establecidas a partir de un cáncer primario. En algunos casos, se trasplantan células cancerosas humanas a un roedor de la presente invención y se administra al roedor un fármaco contra el cáncer. La eficacia del fármaco puede determinarse al evaluar si el crecimiento o la metástasis de las células cancerosas humanas en el roedor se inhibe como resultado de la administración del fármaco.

En casos específicos, el fármaco contra el cáncer es una molécula de anticuerpo, que se une a un antígeno en células cancerosas humanas. En casos particulares, el fármaco contra el cáncer es un anticuerpo biespecífico que se une a un antígeno en células cancerosas humanas, y a un antígeno en otras células humanas, por ejemplo, células del sistema inmunológico humano (o "células inmunitarias humanas") tales como células B y células T.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para los expertos en la técnica una descripción de cómo realizar y usar métodos y composiciones de la presente invención. A menos que se indique de cualquier otra manera, la temperatura se indica en Celsius, y la presión es la atmosférica o cercana a ella.

Ejemplo 1. Humanización de un gen endógeno del grupo de diferenciación 274 (CD274)

Este ejemplo ilustra métodos ilustrativos para la humanización de un gen de CD274 endógeno que codifica el ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1) en un animal no humano tal como un roedor (por ejemplo, un ratón). Los métodos descritos en este ejemplo pueden emplearse para humanizar un gen de CD274 endógeno de un animal no humano con el uso de cualquier secuencia, o combinación de secuencias humanas (o fragmentos de secuencias) según convenga. En este ejemplo, un fragmento de ADN humano de ~8444 pb que contiene los exones 3, 4 y 5 (en parte) de un gen CD274 humano que aparece en el acceso de GenBank NM_014143.3 (SEQ ID NO:11) se emplea para humanizar un gen *Cd274* endógeno de un ratón. Un vector de transformación para la humanización del material genético que codifica el dominio extracelular, que incluye un dominio IgV N-terminal y un dominio tipo IgC2, de un gen *Cd274* endógeno se construyó mediante el uso de la tecnología VELOCIGENE® (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 6,586,251 y Valenzuela y otros, 2003, Nature Biotech. 21 (6):652-659).

Brevemente, el clon RP23-467A9 del cromosoma artificial bacteriano (BAC) de ratón (Invitrogen) se modificó para eliminar las secuencias codificantes de los exones 3, 4 y 5 (en parte) de un gen *Cd274* endógeno de ratón (~8942 pb) e insertar los exones 3, 4 y 5 (en parte) de un gen CD274 humano mediante el uso de un fragmento de ADN humano de ~8444 pb, que codifica los aminoácidos 19-238 de un polipéptido PD-L1 humano. Se conservó el ADN endógeno que contiene el exón 1, el exón 2, el exón 6 y el exón 7, así como las regiones no traducidas (UTR). El análisis de la secuencia del fragmento de ADN humano de ~8444 pb confirmó todos los exones de CD274 humano (es decir, los exones 3, 4 y 5 en parte) y las señales de corte y empalme. El análisis de la secuencia reveló que la secuencia coincidía con el transcrito de CD274 NM014143.3. En primer lugar, el fragmento de ADN humano de ~8444 pb se amplificó en dos porciones (Figura 2, parte superior). Una porción 5' (~4494 pb) que contiene un exón 2 y parte del intrón 3 del CD274 humano se amplificó por PCR mediante el uso de un cebador 3' que contenía un sitio de restricción NheI y un cebador 5' que contenía una caja de homología de ratón para facilitar la recombinación homóloga en bacteria. Una porción 3' (~3950 pb) que contiene parte del intrón 3, el exón 4, el intrón 4 y parte del exón 5 (~32 pb) se amplificó por PCR mediante el uso de un cebador 5' que contenía un sitio de restricción XhoI y un cebador 3' que contenía una caja de homología de ratón para facilitar la recombinación homóloga en bacteria. Los productos de la PCR se purificaron a partir de gel y se digirieron por separado con las endonucleasas de restricción correspondientes. Los sitios de restricción NheI-XhoI se emplearon para ligar los fragmentos de ADN de ~4494 pb y ~3950 pb a los extremos 5' y 3' de un casete de neomicina autoeliminable de ~4996 pb (loxP-hUb1-em7-Neo-pA-mPrm1-Crei-loxP; ver las patentes de Estados Unidos núm. 8,697,851, 8,518,392 y 8,354,389) en orientación inversa a los fragmentos de ADN que contienen la secuencia codificante de CD274 humano. La selección posterior empleó neomicina. Por diseño, la unión entre la porción del exón 5 de CD274 humano (es decir, 32 pb iniciales) y el exón 5 de *Cd274* endógeno conservó el marco abierto de lectura en el exón 5 (Figura 2) y creó un exón 5 de CD274 único (AACTACCTCTGGCA-CATCCTCCAAATGAAA GGACTCACTG GGTGCTTCTG GGATCCATCC TGTTGTTTCT CATTGTAGTG TCCACG-GTCC TCCTCTTCTT GAGAAAACAA G; SEQ ID NO:12). El vector de transformación resultante contenía, de 5' a 3', un brazo de homología 5' que contiene ~92,9 kb de ADN genómico de ratón del clon RP23-467A9 de BAC, un fragmento de ADN humano de ~4494 pb que contiene el exón 3 y parte del intrón 3 de un gen CD274 humano, un casete de neomicina autoeliminable flanqueado por sitios *loxP*, un fragmento de ADN humano de ~3950 pb que contiene parte del intrón 3, el exón 4, el intrón 4 y los primeros 32 pb del exón 5 de un gen CD274 humano y ~67,6 kb de ADN genómico de ratón del clon RP23-467A9 de BAC.

El clon RP23-467A9 modificado descrito anteriormente se usó para electroporar células madre embrionarias (ES) de ratón para crear células ES modificadas que comprenden un gen de CD274 endógeno humanizado desde el exón 3 hasta parte del exón 5 (es decir, una delección de ~8964 del gen *Cd274* endógeno e inserción de ~8444 pb de una secuencia de CD274 humana). Las células ES transformadas positivamente que contenían un gen de CD274 humanizado se identificaron mediante un ensayo (Valenzuela y otros, supra) que detectó la presencia de las secuencias de CD274 humanas (por ejemplo, el exón 3, 4 y parte del exón 5) y confirmó la delección y/o retención de las secuencias de *Cd274* de ratón (por ejemplo, el exón 3, 4 y parte del exón 5, y/o los exones 1, 2, 6 y 7). La Tabla 4 expone las secuencias ilustrativas de los cebadores y sondas que se usaron para confirmar la humanización de un gen *Cd274* endógeno de ratón como se describió anteriormente (ilustrado en la Figura 3).

Las secuencias de nucleótidos a través de varias uniones se representan en los diagramas de la Figura 2. La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción aguas arriba incluyó lo siguiente, que indica la secuencia de *Cd274* endógeno de ratón (contenida dentro del paréntesis a continuación) contigua a la secuencia de CD274 humana aguas abajo del punto de inserción: (TAACCTTTTA CCCAGGTTTT CAGATGTGTT TGGAGGAGTT TTCTGTCTTC TGAC_3CiGCTCiG TCCTCTTTCCT TTTCAGCGTTTACT) GTCAGGTTCC CAAGGACCTA TATGTGGTAGAGTATGGTAGCAATATGACAATTGAATGCA AATCCCCAGTAGAA (SEQ ID NO: 13).

La secuencia de nucleótidos a través del extremo 5' del casete de neomicina autoeliminable incluyó lo siguiente, que indica la secuencia de CD274 humana contigua a la secuencia del casete (contenida dentro del paréntesis a continuación con un sitio de restricción NheI en cursiva y una secuencia loxP en letra en negrita) aguas abajo del punto de inserción:

TTTGATTAA CTCTCTGTGA AGAAATTACC TCACAAATCT ATTGCTGTC
(GCTAGCTCGCTACCTT AGGACCGTTA TAGTTACTAG C
ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATTCCAGACATG

ATAAGATACA TTGATGAGTT TGGACAAACC ACAACTAGAA TGCAGTGAAA
 AAAATGCTTT ATTTGTGAAA TTTGTGATGC TATTGCTTTA TTTGTAACCA
 TTATAAGCTG) (SEQ ID NO: 14).

- 5 La secuencia de nucleótidos a través del extremo 3' del casete de neomicina autoeliminable incluyó lo siguiente, que indica la secuencia del casete (contenida dentro del paréntesis a continuación con la secuencia loxP en letra en negrita y un sitio de restricción XhoI en cursiva) contigua a la secuencia de *CD274* humana aguas abajo del punto de inserción:

(GTGAGGAGGG GGGCGCCCGC GGGAGGCGCC AAAACCCGGC
 10 GCGGAGGCCA TGCAT **ATAACTTCGT ATAGCATACA TTATACGAAG**
 TTATCTCGAG) CTTGGTAAAG GAATGGAGAA TTAAGGCTCT AGATCATTAG
 TGGTTACACT ATAGTATTAG AAGTAAAAA AAGATTATAC CAACAAAATA
 AGAACATGTT AATGTACTTG TAATGAATAA ACATGAATAA AGCTCTTATG
 CTATA (SEQ ID NO: 15).

- 15 La secuencia de nucleótidos a través del extremo 3' de la secuencia de *CD274* humana incluyó lo siguiente, que indica la secuencia de *CD274* humana contigua a la secuencia de *Cd274* de ratón (contenida dentro del paréntesis a continuación): TTTATCTTTA GTCAGTTTGT TTTCGTTTTGT TTTGTTTTTC AGAACTACCT CTGGCACATC
 20 CTCCAAATGA AAGG (ACTCACTGGG TGCTTCTGGG ATCCATCCTG TTGTTCTCTCA TTGTAGTGTC
 CACGGTCCTC CTCTTCTTGA GAAACAAGG TATTTCTCCTCATTG) (SEQ ID NO:16).

- La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción después de la delección del casete de neomicina incluyó lo siguiente, que indica la yuxtaposición de la secuencia genómica humana con la secuencia loxP restante de la secuencia del casete (contenida dentro del paréntesis a continuación con los sitios de restricción NheI y XhoI en cursiva y la secuencia loxP en letra en negrita): TCCTAGCCG TTTTGTATTA ACTCTCTGTG AAGAAATTAC
 25 CTCACAAATCT ATTGCTGTC (GCTAGCTCGCTACCTT AGGACCGTTA TAGTTACTAGCATAAAGTTTCGT
ATAGCATACATTATACGAAGTTATCTCGAG)CTTGGTAAAGGAATGGAGAA TTAAGGCTCTAGATCATTAGTGGT
 TACACTATAGTATTAGAAGTAAAAAAA GATTATACCAACAAAATAAGAA (SEQ ID NO: 17).

- 30 Después, los clones de células ES positivas se usaron para su implantación en ratones hembras mediante el uso del método VELOCIMOUSE® (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 7,294,754 y Poueymirou y otros, 2007, Nature Biotech. 25(1):91-99) para generar una camada de crías que contienen una inserción de los exones 3, 4 de *CD274* humano y parte del exón 5 de *CD274* humano en un gen *Cd274* endógeno de ratón. Los ratones portadores de la humanización de los exones 3, 4 y 5 en parte (es decir, el fragmento de ADN humano de ~8444 pb) de un gen
 35 *Cd274* endógeno se volvieron a confirmar e identificar mediante la genotipificación del ADN aislado a partir de pedazos de cola mediante el uso de un ensayo (Valenzuela y otros, supra) que detectó la presencia de las secuencias del gen *CD274* humano. Las crías se genotipifican y las cohortes de animales heterocigotos para el constructo del gen de *Pdcd1* humanizado se seleccionan para su caracterización. Los ratones también se crían hasta la homocigosis.

40

Tabla 4			
Nombre	Descripción	Secuencia (5'-3')	
7096 hTU	Cebador directo	CCGGCTGTTGAAGGACCAG	SEQ ID NO:18
	Sonda	TCTCCCTGGGAAATGCTGCACTTCAG	SEQ ID NO:19
	Cebador inverso	TGCATCCTGCAATTTACATCTG	SEQ ID NO:20
7096 hTD	Cebador directo	ACACAGGTATCTCGCCATTCC	SEQ ID NO:21
	Sonda	AGCCACTCAAACCTTTGGCATT	SEQ ID NO:22
	Cebador inverso	GGTCATCCTTGAAGTTTAGTTAGC	SEQ ID NO:23
7096 TU	Cebador directo	CAGGACGCAGGCGTTTAC	SEQ ID NO:24
	Sonda	CTGCATAATCAGCTACGGTGGTGCGG	SEQ ID NO:25
	Cebador inverso	TTCAGCGTGATTCGCTTGTAG	SEQ ID NO:26
7096 TD	Cebador directo	CTGGAGTGCCCAAGAGTC	SEQ ID NO:27
	Sonda	CAGACATGGAAGAAACACAACCCGCAC	SEQ ID NO:28
	Cebador inverso	CTGCTAAGCCGCTTCTGTC	SEQ ID NO:29

60

Ejemplo 2. Expresión de PD-L1 humanizado en células T activadas

- Este Ejemplo demuestra que los animales no humanos (por ejemplo, roedores) modificados de manera que contengan un gen de *CD274* humanizado de acuerdo con el Ejemplo 1 expresan un polipéptido PD-L1 humanizado en la superficie de linfocitos activados. En este Ejemplo, las células T activadas de ratones de tipo silvestre y ratones cuyo

genoma contenía un gen de CD274 humanizado como se describió en el Ejemplo 1 se tiñeron con anticuerpos anti-PD-L1 comerciales para determinar la expresión de PD-L1 en células T estimuladas y sin estimular.

Brevemente, los bazos se recolectaron y se procesaron a partir de un ratón de tipo silvestre y un ratón homocigoto para un gen de CD274 endógeno como se describió en el Ejemplo 1 en suspensiones de células individuales mediante disociación mecánica. Las células se lavaron en medio (RPMI suplementado con FBS al 10 %) y se resuspendieron a $1 \times 10^6/\text{ml}$ y se sembraron 200 μl (200 000 células) en placas de 96 pocillos. Las células en pocillos seleccionados se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (ambos a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 72 horas. Las células se tiñeron para FACS de acuerdo con las especificaciones del fabricante con anticuerpos que reconocen CD3, CD4, CD8 y PD-L1 humano (clon MIH1, BD Biosciences) o de ratón (clon 10F.9G2, eBioscience). Las células teñidas se analizaron en el citómetro de flujo LSRII y los datos se analizaron con el uso del programa informático FLOWJO™. Las células T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺) y T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺) se clasificaron y analizaron para determinar la expresión de PD-L1 humano y de ratón. En la Tabla 5 se exponen ejemplos de valores de intensidad de fluorescencia media.

Como se muestra en la Tabla 5, los ratones portadores de un gen de CD274 humanizado como se describió en el Ejemplo 1 expresan un polipéptido PD-L1 que comprende una porción humana y una porción endógena en células T activadas. La porción humana se expresa de manera detectable por medio del reconocimiento con un anticuerpo que es reactivo a un polipéptido PD-L1 completamente humano, cuyo anticuerpo no reconoce un polipéptido PD-L1 de ratón en ratones de tipo silvestre. Por el contrario, el clon de anticuerpo anti-PD-L1 de ratón 10F.9G2 demostró un alto nivel de tinción para PD-L1 de ratón en ratones de tipo silvestre después de la estimulación con anti-CD3/anti-CD28, y un nivel marginal de tinción en ratones con PD-L1 humanizado. Lo más probable es que esto se deba a una reactividad cruzada parcial con PD-L1 humano.

Tabla 5

		Intensidad de fluorescencia media			
		Células T CD8 ⁺		Células T CD4 ⁺	
Genotipo	Muestra	$\alpha\text{-hPD-L1}$	$\alpha\text{-mPD-L1}$	$\alpha\text{-hPD-L1}$	$\alpha\text{-mPD-L1}$
CD274 humanizado	Control de isotipo	78	84	-55	-52
	Sin estimular	271	160	114	61
	Estimuladas	384	276	457	155
	Control de isotipo	64	64	-58	-39
tipo silvestre	Sin estimular	62	712	-45	538
	Estimuladas	113	3174	22	2805
$\alpha\text{-hPD-L1}$: anti-PD-L1 humano					
$\alpha\text{-mPD-L1}$: anti-PD-L1 de ratón					

Ejemplo 3. Eficacia *in vivo* de moduladores de PD-L1

Este Ejemplo demuestra que los animales no humanos (por ejemplo, roedores) modificados de manera que contengan un gen de CD274 humanizado de acuerdo con el Ejemplo 1 pueden usarse en un ensayo *in vivo* para cribar moduladores de PD-L1 (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1) y determinar varias características tales como, por ejemplo, reducción del crecimiento tumoral y/o muerte de células tumorales. En este Ejemplo, se criban varios anticuerpos anti-PD-L1 en ratones homocigotos para la humanización de un gen de CD274 endógeno (como se describió en el Ejemplo 1) inyectados por vía subcutánea con células tumorales MC38.ova para determinar la dosis óptima de anticuerpo que promueve la regresión del tumor y la medida en que los anticuerpos anti-PD-L1 median la muerte de las células tumorales.

Brevemente, los ratones se dividieron uniformemente de acuerdo al peso corporal en cinco grupos de tratamiento o de control para el Estudio 1 (n=5 a 8 ratones por grupo) o se asignaron aleatoriamente a siete grupos de tratamiento para el Estudio 2 (n=5 a 6 ratones). Los animales del Estudio 1 se anestesiaron por inhalación de isoflurano y después se inyectaron por vía subcutánea en el costado derecho con 1×10^6 células MC38.ova en suspensión de 100 μl de DMEM (día 0). Las células MC38.Ova (adenocarcinoma de colon de ratón) se modificaron genéticamente para expresar ovoalbúmina de pollo para aumentar la inmunogenicidad del tumor y permitir la monitorización de las respuestas inmunitarias de células T a péptidos de ovoalbúmina antigénicos bien definidos. Las células MC38.ova también se transdujeron con un vector lentiviral que expresa PD-L1 humano de longitud completa bajo el control de un promotor viral SFFV, y se clasificaron en cuanto a la expresión positiva de PD-L1 humano (MC38.ova/hPD-L1) por citometría de flujo con el uso de un anticuerpo específico para PD-L1 humano (clon MIH1, BD Biosciences). Las células MC38.ova también expresan un nivel bajo de PD-L1 endógeno de ratón. Los grupos de tratamiento del Estudio 1 se inyectaron por vía intraperitoneal con 500 p.g de uno de los tres anticuerpos anti-PD-L1 o uno de los dos anticuerpos de control de isotipo no específicos para PD-L1 en los días 3, 7, 10, 14 y 17. Un solo grupo de animales se dejó sin tratar. Los animales del Estudio 2 también recibieron un implante subcutáneo de 1×10^6 células MC38.Ova/hPD-L1 (día 0), sin embargo, a los grupos de tratamiento del estudio 2 se les administró por vía intraperitoneal un anticuerpo anti-PD-L1 (Ab A, Ab B o Ab C) o anticuerpos de control (es decir, no específicos para PD-L1) a dosis de 10 mg/kg o 5 mg/kg. A los grupos de tratamiento se les administró en los días 3, 7, 10, 14 y 17. El protocolo de dosificación y tratamiento experimental para cada estudio se expone en la Tabla 6.

Tabla 6

Estudio 1		Estudio 2	
Anticuerpo	Dosis (μg)	Anticuerpo	Dosis (mg/kg)
Ab A	500	Ab A	10
Ab B	500	Ab A	5
Ab C	500	Ab B	10
Control 1	500	Ab B	5
Control 2	500	Ab C	10
		Ab C	5
		Control 1	10

Para cada estudio, los volúmenes tumorales se monitorizaron por medición con calibre dos veces por semana durante la duración del experimento (17 días para el Estudio 1, 21 días para el Estudio 2) y se registró el por ciento de supervivencia al final de cada estudio. También se dio una puntuación del número de ratones libres de tumor al final de cada estudio. En las Tablas 7 y 8 se exponen resultados ilustrativos, expresados como volumen tumoral medio ($\text{mm}^3 \pm \text{SD}$), por ciento de supervivencia y número de ratones libres de tumor. Las curvas de crecimiento tumoral ilustrativas se proporcionan en la Figura 4.

Tabla 7

Estudio 1					
Anticuerpo	Volumen tumoral medio ($\text{mm}^3 \pm \text{SD}$)		Supervivencia (%)		Ratones libres de tumor
	Día 10	Día 17	Día 10	Día 17	Día 17
Ab A	6 \pm 10	2 \pm 5	100	100	4/5
Ab B	16 \pm 17	0 \pm 0	100	100	5/5
Ab C	13 \pm 14	0 \pm 0	100	100	5/5
Control 1	65 \pm 27	148 \pm 109	100	100	0; 5
Control 2	54 \pm 44	80 \pm 63	100	100	0/5

Tabla8

Estudio 2

Anticuerpo	Volumen tumoral medio (mm ³ ±SD)						Supervivencia (%)						Ratones libres de tumor		
	Día 10			Día 21			Día 10			Día 21			Día 21		
	10 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	5 mg/kg
Ab A	14±15 18±	17±4	19±922	108±101	100	100	100	100	100	100	100	100	3/6	2/5	
Ab B	10	23±10	34±81	231 ±238	100	100	100	100	100	100	100	100	5/6	1/5	
Ab C	10±8	25±929	7±16	37±59	100	100	100	100	100	100	100	100	5/6	3/5	
Control 1	55±37	N/P	534±356	N/P	100	100	100	N/P	100	100	N/P	0/6	N/P		

Para el Estudio 1, los tres anticuerpos anti-PD-L1 fueron eficaces para promover la regresión del tumor a 500 µg/ratón y todos los ratones de los grupos de tratamiento que recibieron Ab B y Ab C estaban libres de tumor en el día 17 (Tabla 7). En el grupo de tratamiento con Ab A, cuatro de cinco ratones (80 %) estaban libres de tumor en el día 17, mientras que ninguno de los animales de los grupos de control estaba libre de tumor. El ANOVA de una vía con prueba posterior de comparaciones múltiples de Dunnett reveló una diferencia significativa en los volúmenes tumorales entre los tratamientos con anticuerpos anti-PD-L1 y los anticuerpos de control con un valor de $p < 0,05$. El control 2 es un anticuerpo de control de isotipo coincidente no relacionado, mientras que el control 1 es un anticuerpo de control de isotipo no coincidente no relacionado.

Para el Estudio 2, la administración de los anticuerpos anti-PD-L1 seleccionados dio como resultado la inhibición del crecimiento tumoral y así promovió la regresión del tumor (Tabla 8). Todos los anticuerpos anti-PD-L1 evaluados fueron eficaces a 10 mg/kg y 5 mg/kg, y promovieron la regresión del tumor en los ratones tratados de una manera dependiente de la dosis durante el transcurso del experimento. Ninguno de los animales tratados con anticuerpos de control estaba libre de tumor (Tabla 8). El ANOVA de una vía con prueba posterior de comparaciones múltiples de Tukey reveló una diferencia significativa en los volúmenes tumorales entre los tratamientos con anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos de control con un valor de $p < 0,05$ o menor. El control 1 es un control de isotipo coincidente no relacionado.

Como se muestra en la Figura 4 y en las Tablas 7 y 8, los anticuerpos anti-PD-L1 inhibieron significativamente el crecimiento tumoral en un modelo profiláctico de crecimiento tumoral de MC38.ova/hPD-L1 en ratones que tienen un gen de CD274 humanizado como se describió en el Ejemplo 1. La terapia con anticuerpo anti-PD-L1 a 10 mg/kg y 5 mg/kg promovió la regresión del tumor en todos los ratones durante el transcurso del experimento, lo que dio como resultado que tres de los seis ratones permanecieran libres de tumor en el grupo con 10 mg/kg y dos de los cinco ratones permanecieran libres de tumor en el grupo de tratamiento con 5 mg/kg en el día 21, mientras que ninguno de los animales permaneció libre de tumor en el grupo de control (0/6) (Figura 4). El ANOVA de una vía con prueba posterior de comparaciones múltiples de Dunnett reveló una diferencia significativa en los volúmenes tumorales en el día 21 entre los tratamientos con anticuerpos anti-PD-L1 y de control con un valor de $p < 0,01$ (grupo de tratamiento con 5 mg/kg) y un valor de $p < 0,0001$ (grupo de tratamiento con 10 mg/kg).

En un experimento similar, se investigó la integridad funcional de la señalización de PD-L1 en ratones que contienen un gen de CD274 humanizado como se describió en el Ejemplo 1 por medición de las respuestas de células T CD8⁺ y CD3⁺ en esplenocitos de ratones portadores de tumor tratados con anticuerpo anti-PD-L1.

Brevemente, se aislaron esplenocitos de ratones que contienen un gen CD274 humanizado como se describió en el Ejemplo 1 tratados con anticuerpo anti-PD-L1 o de control al final del experimento el día 21 (descrito anteriormente). Se aisló el ARN total y se realizó la PCR en tiempo real del ADNc obtenido por transcripción inversa mediante el uso de oligonucleótidos y una mezcla de sondas TAQMAN™ específicas para CD8b de ratón, CD3ζ de ratón (Mm00446171_m1, Applied Biosystems), PD-L1 humano y PD-L1 de ratón (Tabla 9). Las muestras se normalizaron con relación a la expresión de ciclofilina B de ratón. Los resultados ilustrativos se proporcionan en la Figura 5.

Tabla 9

Nombre	Descripción	Secuencia (5'-3')	
mCD8b	Cebador directo	GCTCTGGCTGGTCTTCAGTATG	SEQ ID NO:30
	Sonda	AGCAGCTCTG CCCTCAT	SEQ ID NO:31
	Cebador inverso	TTGCCGTATGGTTGGTTTGAAC	SEQ ID NO:32
hPD-L1	Cebador directo	ACAGCCTGCTGTCACCTTGC	SEQ ID NO:33
	Sonda	TACGGGCGTTTACTGTACAC	SEQ ID NO:34
	Cebador inverso	ACCACATATAGGTCCTTGGGAAC	SEQ ID NO:35
mPD-L1	Cebador directo	TTCTCAATGTGACCAGCAGTC	SEQ ID NO:36
	Sonda	AGGGTCAACGCCACAGCGAATGA	SEQ ID NO:37
	Cebador inverso	TCCTGTTCTGTGGAGGATGTG	SEQ ID NO:38

Como se muestra en la Figura 5, la administración del anticuerpo anti-hPD-L1 indujo un aumento en el número de células T CD8⁺ y CD3⁺ en esplenocitos de ratones que contienen un gen de CD274 humanizado (como se describió en el Ejemplo 1) y que portan tumores de MC38.ova/hPD-L1. Esto confirma que los ratones que contienen un gen de CD274 humanizado (como se describió en el Ejemplo 1) demuestran una expresión y señalización adecuadas mediante PD-L1 humanizado en la superficie celular dado que la expresión de PD-L1 en las células MC38.ova no fue capaz de suprimir la proliferación de células T CD8⁺ antitumorales. En general, se observó el aumento demostrado en las células T en comparación con los ratones tratados con control para ambos grupos de tratamiento, sin embargo, la diferencia estadística en los niveles de CD8b (valor de $p < 0,01$) y CD3 ($p < 0,001$) mediante el uso de un ANOVA de una vía con la prueba posterior de comparaciones múltiples de Dunnett solo se alcanzó entre los grupos de tratamiento con anticuerpo anti-PD-L1 a 10 mg/kg y de control.

La expresión del ARNm de PD-L1 humano se midió con sondas específicas para humano diseñadas para la porción

extracelular de un polipéptido PD-L1 humano (Tabla 9) y se confirmó la expresión adecuada de la proteína PD-L1 humanizada en la superficie celular (Figura 5). Adicionalmente, la medición de la expresión del ARNm de PD-L1 de ratón con cebadores diseñados para detectar la porción extracelular de PD-L1 de ratón (Tabla 9) no produjo un producto. Estos datos confirman los resultados de citometría de flujo presentados en la Tabla 5, es decir, los ratones con PD-L1 humanizado de hecho expresan PD-L1 humanizado que está intacto y es funcional en la superficie celular.

En conjunto, este ejemplo demuestra que los roedores de la presente invención pueden usarse para evaluar la eficacia *in vivo* de fármacos (por ejemplo, anticuerpos) dirigidos a PD-L1, y tales roedores son útiles para discriminar el efecto terapéutico de los anticuerpos anti-PD-L1. Por otra parte, los roedores descritos en la presente descripción pueden usarse para evaluar la medida en la que los fármacos dirigidos a PD-L1 pueden promover la regresión de tumores y/o mediar la muerte de las células tumorales. Los roedores (por ejemplo, ratones) de la presente invención demuestran la expresión del polipéptido PD-L1 humanizado funcional en la superficie celular y la regulación adecuada de PD-L1 de las respuestas inmunitarias por medio de la inhibición de la supresión de células T CD8⁺ dependiente de PD-L1 en un modelo de tumor.

Equivalentes

Habiendo descrito así varios aspectos de al menos una modalidad de esta invención, los expertos en la técnica deberán apreciar que a los expertos en la técnica se les ocurrirán fácilmente varias alteraciones, modificaciones y mejoras. En consecuencia, la descripción y los dibujos anteriores son solo a manera de ejemplo y la invención se describe en detalle en las reivindicaciones que siguen.

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un vector de ácido nucleico, que comprende un gen del grupo de diferenciación 274 (CD274) humanizado que codifica un polipéptido del ligando de muerte programada 1 (PD-L1) humanizado, en donde dicho gen de CD274 humanizado comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia extracelular de un polipéptido PD-L1 humano, unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia intracelular y la secuencia transmembrana de un polipéptido PD-L1 de roedor.
2. El vector de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia intracelular y la secuencia transmembrana del polipéptido PD-L1 de roedor comprende el exón 6, el exón 7 y una porción del exón 5 del gen de CD274 de roedor, y opcionalmente en donde el gen de CD274 humanizado comprende además el exón 1 y el exón 2 del gen de CD274 de roedor.
3. El vector de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia extracelular del polipéptido PD-L1 humano comprende el exón 3, el exón 4 y una porción del exón 5 de un gen de CD274 humano.
4. Un polipéptido PD-L1 humanizado aislado, que comprende la secuencia extracelular de un polipéptido PD-L1 humano, unida operativamente a la secuencia intracelular y la secuencia transmembrana de un polipéptido PD-L1 de roedor, opcionalmente en donde la secuencia extracelular del polipéptido PD-L1 humano comprende los aminoácidos 19-238 de la SEQ ID NO: 4.
5. Un roedor modificado genéticamente cuyo genoma comprende un gen de CD274 humanizado que codifica un polipéptido PD-L1 humanizado en un locus de CD274 endógeno, y un gen de *Pdcd1* humanizado que codifica un polipéptido PD-1 humanizado en un locus de *Pdcd1* endógeno,

en donde dicho gen de CD274 humanizado comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia extracelular de un polipéptido PD-L1 humano, unida operativamente a

 - (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia intracelular y la secuencia transmembrana de un polipéptido PD-L1 endógeno de roedor, y
 - (ii) un promotor de CD274 endógeno de roedor; y

en donde el polipéptido PD-1 humanizado comprende una porción extracelular de un polipéptido PD-1 humano y una porción intracelular de un polipéptido PD-1 endógeno de roedor.
6. El roedor modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia intracelular y la secuencia transmembrana del polipéptido PD-L1 endógeno de roedor comprende el exón 6, el exón 7 y una porción del exón 5 del gen de CD274 endógeno de roedor, y opcionalmente en donde el gen de CD274 humanizado comprende además el exón 1 y el exón 2 del gen de CD274 endógeno de roedor.
7. El roedor modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia extracelular del polipéptido PD-L1 humano comprende el exón 3, el exón 4 y una porción del exón 5 de un gen de CD274 humano.
8. El roedor modificado genéticamente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde el gen de *Pdcd1* humanizado comprende el exón 2 y una porción 5' del exón 3 de un gen *PDCD1* humano, unidos operativamente al exón 1, una porción 3' del exón 3, el exón 4 y el exón 5 de un gen *Pdcd1* endógeno de roedor.
9. Un método para evaluar las propiedades farmacocinéticas de un fármaco dirigido a PD-L1 humano, el método comprende las etapas de

administrar un fármaco dirigido a PD-L1 humano a un roedor cuyo genoma comprende un gen de CD274 humanizado que codifica un polipéptido PD-L1 humanizado en un locus de CD274 endógeno, en donde dicho gen de CD274 humanizado comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia extracelular de un polipéptido PD-L1 humano, unida operativamente a

 - (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia intracelular y la secuencia transmembrana de un polipéptido PD-L1 endógeno de roedor, y
 - (ii) un promotor de CD274 endógeno de roedor;

y en donde dicho roedor expresa el polipéptido PD-L1 humanizado en la superficie de una célula de dicho roedor; y realizar un ensayo para determinar una o más propiedades farmacocinéticas del fármaco dirigido a PD-L1 humano.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia intracelular y la secuencia transmembrana del polipéptido PD-L1 endógeno de roedor comprende el exón 6, el exón 7 y

una porción del exón 5 del gen de CD274 endógeno de roedor, y opcionalmente en donde el gen de CD274 humanizado comprende además el exón 1 y el exón 2 del gen de CD274 endógeno de roedor.

- 5 11. El método de la reivindicación 9 o 10, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia extracelular del polipéptido PD-L1 humano comprende el exón 3, el exón 4 y una porción del exón 5 de un gen de CD274 humano.
- 10 12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde el genoma del roedor comprende un gen de *Pdcd1* humanizado que codifica un polipéptido PD-1 humanizado en un locus de *Pdcd1* endógeno, en donde el polipéptido PD-1 humanizado comprende una porción extracelular de un polipéptido PD-1 humano y una porción intracelular de un polipéptido PD-1 endógeno de roedor.
- 15 13. El método de la reivindicación 12, en donde el gen de *Pdcd1* humanizado comprende el exón 2 y una porción 5' del exón 3 de un gen *PDCD1* humano, unidos operativamente al exón 1, una porción 3' del exón 3, el exón 4 y el exón 5 de un gen *Pdcd1* endógeno de roedor.
- 20 14. El vector de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, el polipéptido PD-L1 humanizado aislado de acuerdo con la reivindicación 4, el roedor modificado genéticamente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-8 y el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en donde el roedor es un ratón.
- 25 15. El vector de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, el polipéptido PD-L1 humanizado aislado de acuerdo con la reivindicación 4, el roedor modificado genéticamente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-8 y el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en donde el roedor es una rata.

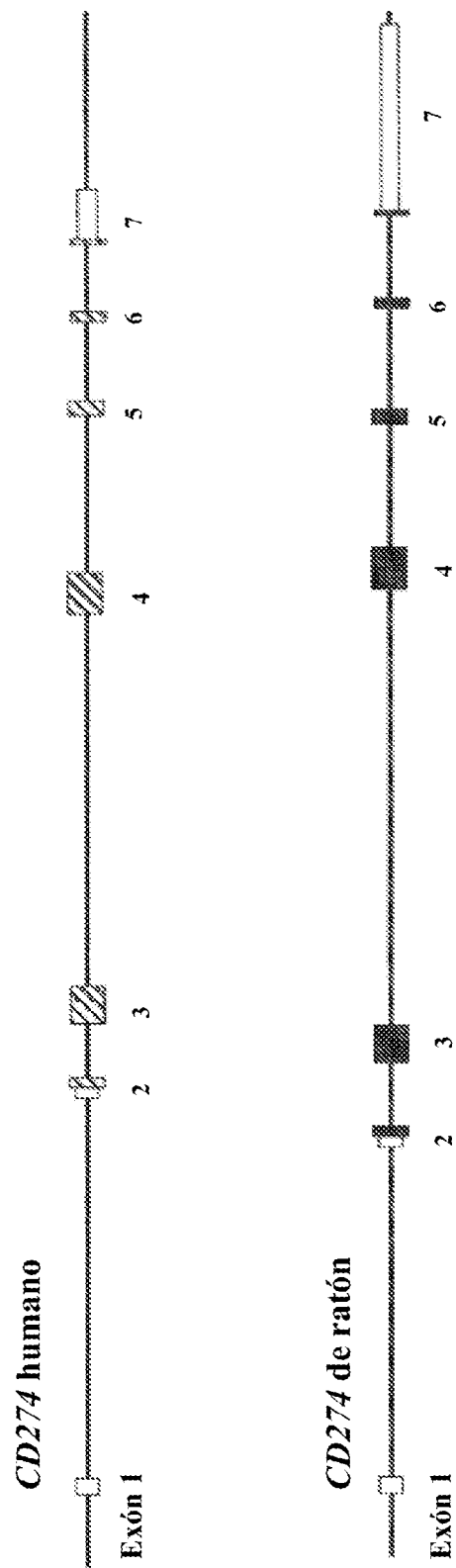


Figura 1

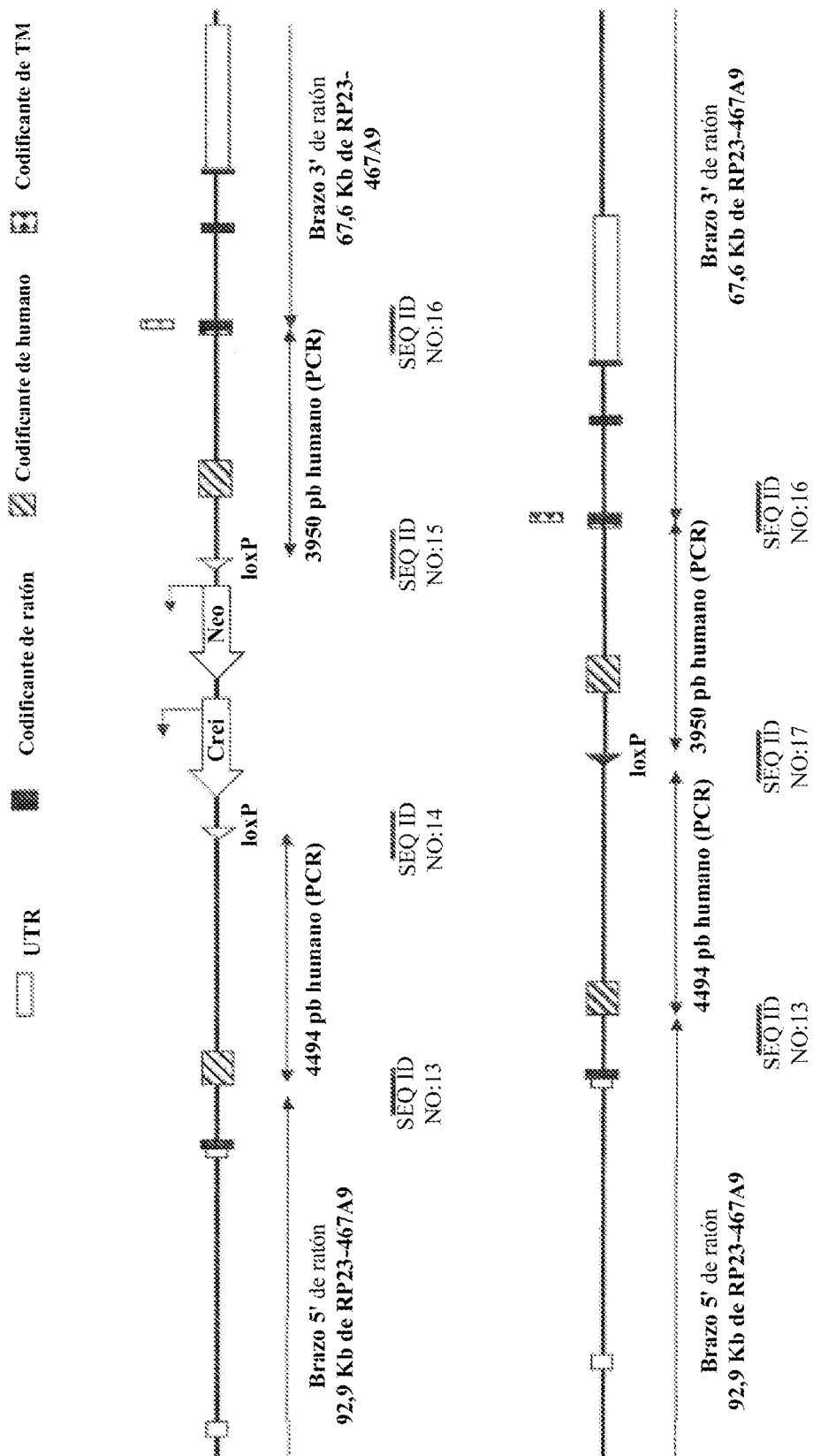


Figura 2

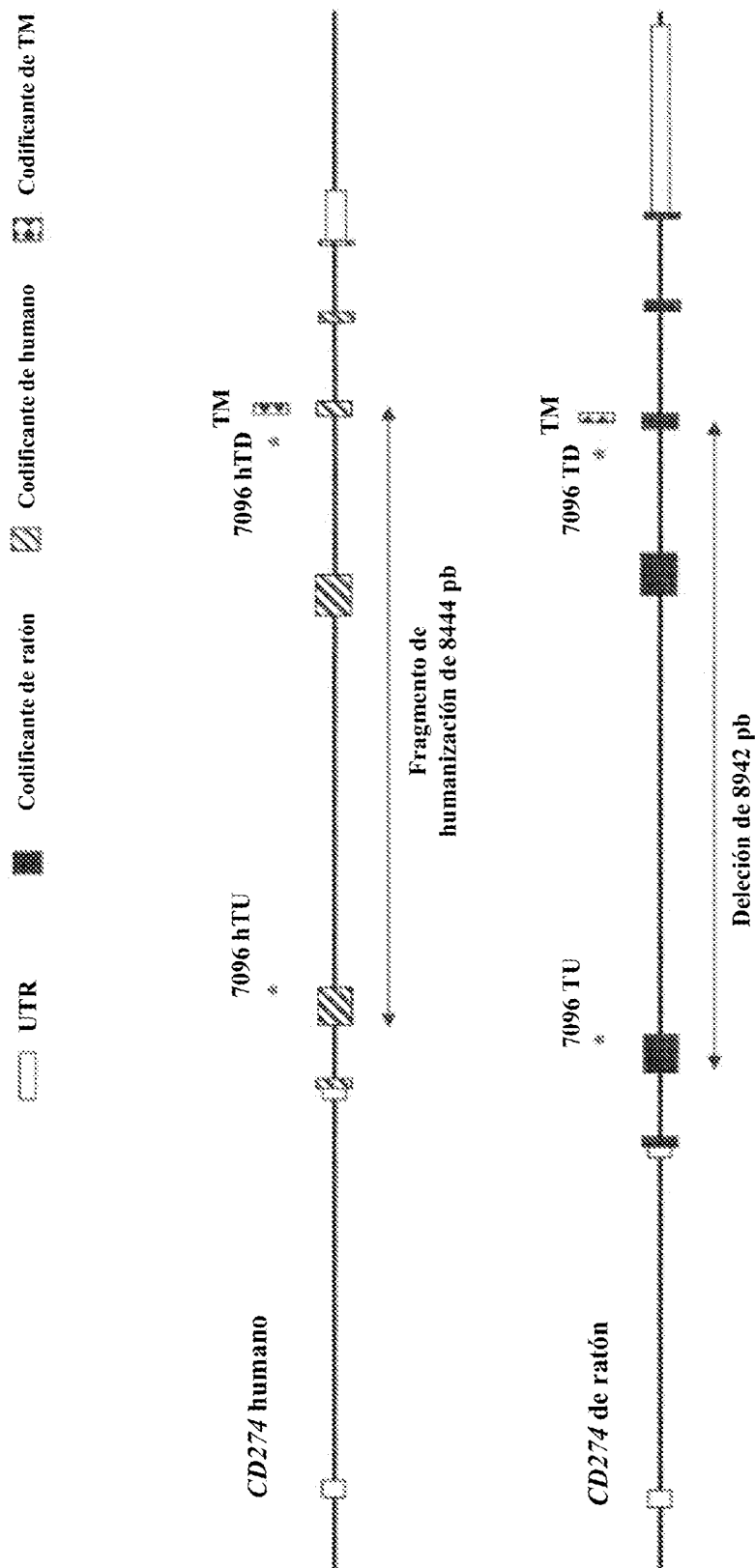


Figura 3

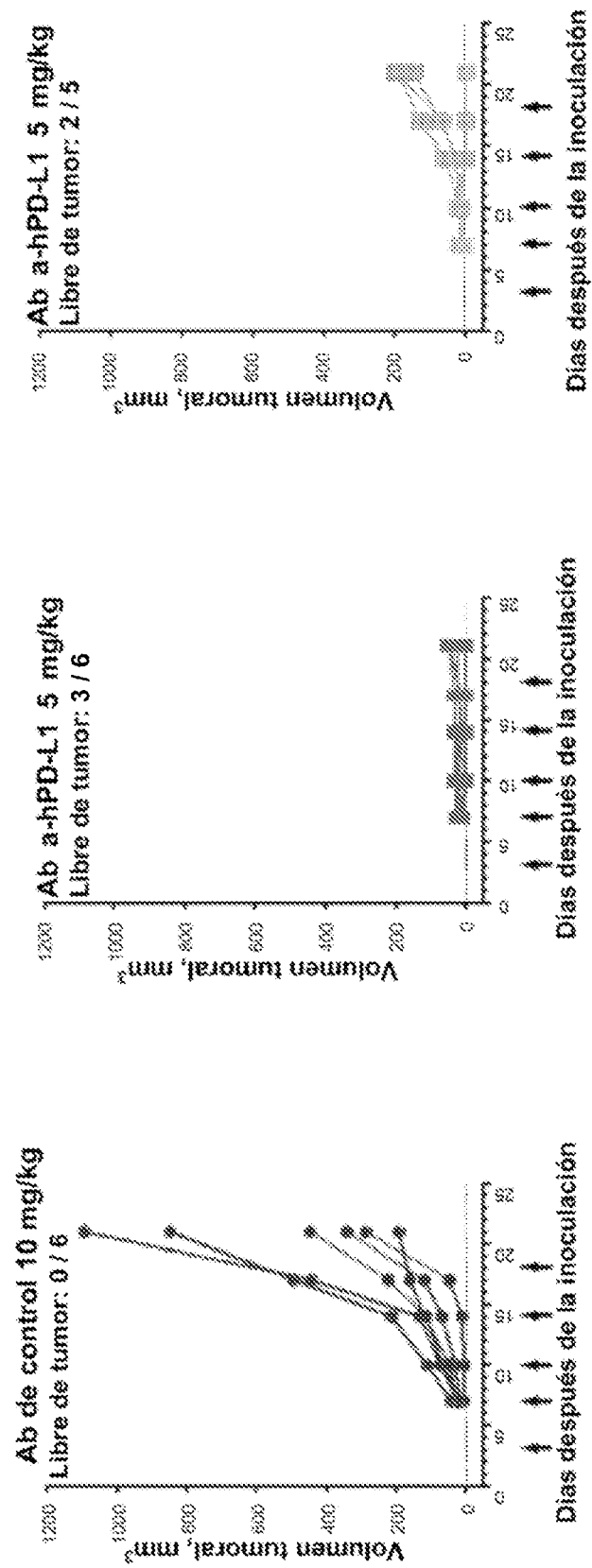


Figura 4

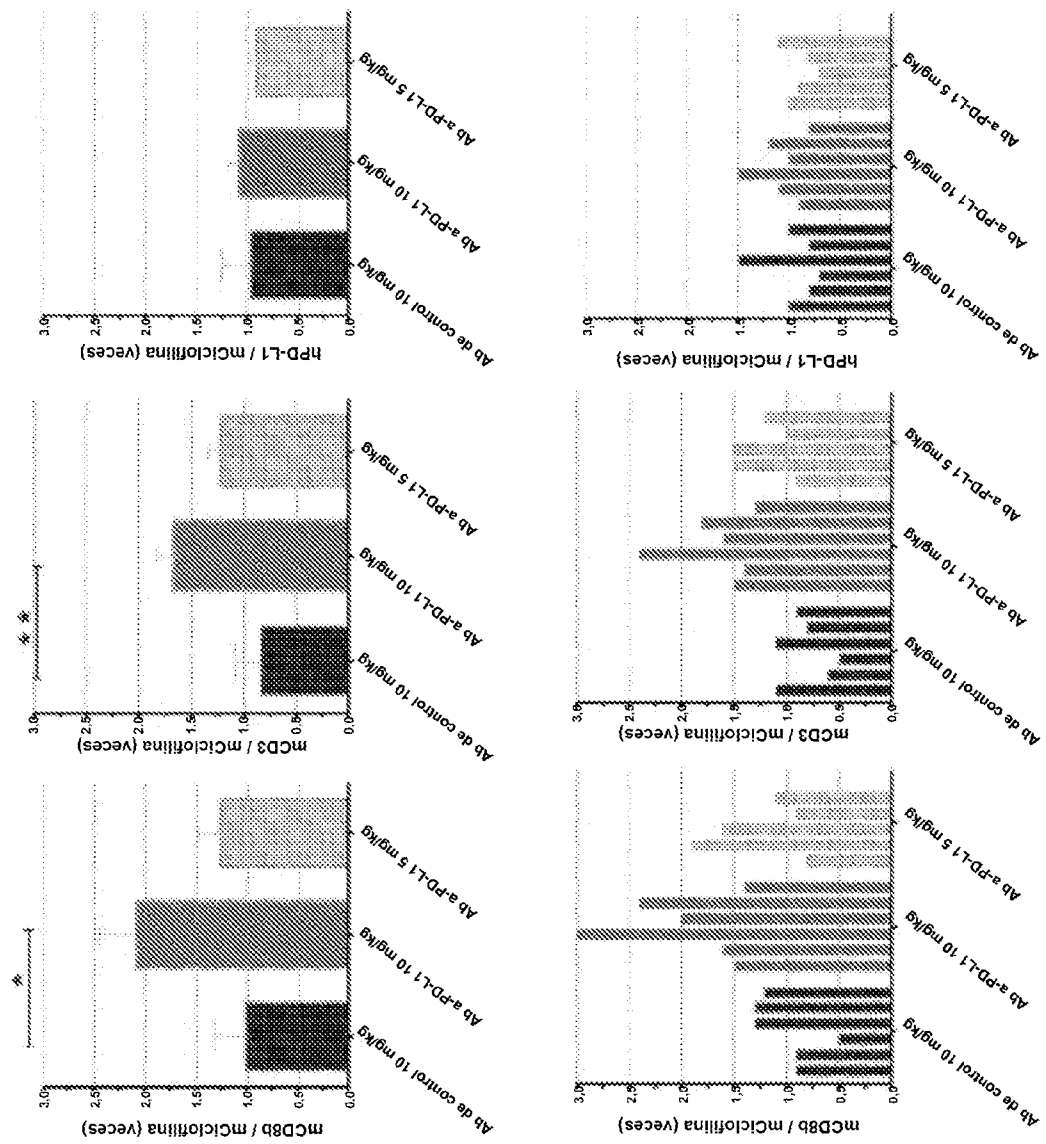


Figura 5

Figura 6

ARNm de CD274 de ratón (NM_021893.3)

GAAATCGTGGTCCCAAGCCTCATGCCAGGCTGCACTTGCACGTGGCGGGCCAGTCTCTCTGGCCTG
 CAGATAGTTCCTCAAAACATGAGGATATTTCCTGGCATTATATTCACAGCCTGCTGTCACTTGGCT
 ACGGGCGTTTACTATCACGGCTCCAAAGGACTTGTACGTTGGTGGAGTATGGCAGCAACGTCA
 CGATGGAGTGCAGATTCCCTGTAGAACGGGAGCTGGACCTGCTTGGCGTTAGTGGTGTACTGG
 GAAAAGGAAGATGAGCAAGTGATTTCAGTTTGTGGCAGGAGAGGAGGACCTTAAGCCTCAGCA
 CAGCAACTTCAGGGGGAGAGCCTCGCTGCCAAAGGACCAGCTTTTGAAGGGAAATGCTGCC
 TTCAGATCACAGACGTCAAGCTGCAGGACCCAGGGCTTTACTGCTGCATAATCAGCTACGGT
 GGTGGCGACTACAAGCGAATCACGCTGAAAGTCAATGCCCCATACCGCAAAATCAACCAGAG
 AATTCCTGGTGGATCCAGCCACTTCTGAGCATGAACTAATATGTCAGGCCGAGGGTTATCCAG
 AAGCTGAGGTAATCTGGACAAACAGTGAACCAACCCGTCAGTGGGAAGAGAAAGTGTACCC
 ACTTCCCGGACAGAGGGGATGCTTCTCAATGTGACCAGCAGTCTGAGGGTCAACGCCACAGC
 GAATGATGTTTTCTACTGTACGTTTGGAGATCACAGCAGGGCAAAACCACACAGCGGAGC
 TGATCATCCCAAGACTGCTTGCACACATCTCCACAGAACAGGACTCACTGGGTGCTTCTG
 GGATCCATCCGTGTGTTCTCATTTGTAGTGTCCACGGTCTCTCTCTTCTTGAGAAAAACAAGTG
 AGAATGCTAGATGTGGAGAAATGTGGCGTTGAAGATACAAGCTCAAAAAACCGAAATGATAC
 ACAATTCGAGGAGACGTAAGCAGTGTGAACCTCTGATCGTGGATTGGCAGCTTGTGGTCTGTG
 AAAGAAAGGGCCCATGGGACATGAGTCCAAAGACTCAAGATGGAACCTGAGGGAGAGAAACCAAG
 AAAGTGTGGGAGAGGAGCCTGGAAACAACGGACATTTTTCACGGGAGACACTGCTAAGCAAGTT
 GCCCATEAGTGGTCTTGGGAAATGGATTGAGGGTTCCTGGCTTAGCAGCTGGTCTTGCACAGTGA
 CCTTTTCTCTGCTCAGTGGCGGGATGAGAGATGGAGTCAATGAGTGTGAAGAATAAGTGCCTTCT
 ATTTATTTTGAAGTCTGTGTGTCTCACTTTGGGCATGTAATTATGACTGGTGAATCTGACGACATG
 ATAGATCTTAAGATGTAGTCACCAAACTCAACTGCTGCTTAGCATCTCTCGTAACTACTGATACAA
 GCAGGGAACACAGAGGTCACCTGCTTGGTGTGACAGGCTCTTGCTGTCTGACTCAAAATAATCTTTAT
 TTTTCAGTCTCTCAAGGCTCTTCGATAAGCAGTTGTTCTGTATCAGCCTTATAGGTGTCAAGGTATAGCA
 CTCAACATCTCATCTCATTACAATAGCAACCTCATCACCATAAGCAACAGCTAACCTCTGTTATCCT
 CACTTCATAGCCAGGAAGCTGAGCGACTAAGTCACTTGGCCACAGAGTATCAGCTCTCAGATTTCT
 GTTCTTCAGCCACTGTCTTTCAGGATAGAATTTGTGCTTAAGAAATTAATTTAAAAACTGATTATT
 GAGTAGCATTTGTATCAATCACAACATGCTTGTGCACTGTGCTGGCCTCTGAGCATAAAGATGT
 ACGCCCGAGTACCGGTCCGACATGTTTATGTGTGTTAAATACTCAGAGAAATGTTTATTAACAAGG
 AGCTTGCAATTTAGAGACACTGGAAAGTAACCTCCAGTTTCATTGTCTAGCATTACATTTAOCCTCATT
 GCTATCCTTGCCATACAGTCTCTTGTCTCCATGAAGTGTCAATGAATCTTGTGTAATAGTTCTTTTAT
 TTTTAAATGTTTCTATTTAAATGATATTGACATCTGAGGCGATAGCTCAGTTGGTAAAACCTTTC
 CTCACAAGTGIGAAACCTGAGTCTTATCCCTAGAAACCCACATAAAAAACAGTTGCGTATGTTGT
 GCATGCTTTTGATGCCAGCACTAGGGAGGACAGAGGACAGGACAGTCTGAGCTCTCATTTGACCACCC
 AGCCTAGCCTACATGGTTAGCTCCAGGCTACAGGAGCTGGCAGAGCCTGAAAAACGATGCCATG
 AC
 GCACCTCTCTACACATGCACACACATACAATTCAACACAAAATCAACAGGGAATGTCTCAGAATG
 GTCCCAAGACAAAGAAGAAGAAAAACACCAAAACAGCTCTATTCCCPCAGCCTATCCCTCTCTACT
 CCTTCCTAGAAGCAACTACTATTGTTTTTGTATATAAATTTACCCAAACGACAGTTAATAATGAGAAT
 ATATATTAAAGTGTCTGTCAATATATATTATCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
 TTTCT
 CTCT
 CCTTTTATTTAATGTATGGATATTTATGCTGCTTCCAGAAATGGATCTAAAGCTCTTGTGTTCTAGGT
 TTTCTCCGCCATCTTCTAGGCATCTCTCACACTGTCTAGGACAGACACCATGTCTGCTGCTGAAAT
 CTGTAGACACCATTTATAAAGCACGTACTACCCGAGTTTGTATTTGGCTTGTCTGTCTGTATTA
 AGGGAGACCATGAGTCCCAGGGTACACTGAGTTACCCCAAGTACCAAGGGGGAGCCTTGTGTTGTG
 CTCCATGCCAGAAAGCAGGCTGGAGCCATTTGGTTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
 TCACTTGCTCATFACAGGTTCTCTTTGGGAATGTACAGCATTGCTCCTTGAATGCTGGCTGCCCTGG
 AAGGAGCCCATFAGCTCTGTGTGAGCCCTTGACAGCTACTGCCCTCTCTTACCACAGGGGCTCTA
 AGATACTGTTACCTAGAGGCTTGGAGGATCTGTGTTCTCTGGGGGGAGGAAAGGAGGAGGAACCC
 AGAACTTCTTACAGTTTCTCTGTGTGTACATGTCAAGACTGAAGGAACAGGCTGGGCTACGTA

Figura 6 (continuación)

GTGAGATCCTGTCTCAAAGGAAAGACGAGCATAGCCGAACCCCGGTGGAACCCCTCTGTTAACCT
 GTTCACACAAGCTTATTGATGAGTCTCATGTGTTAATGTCTTGTGTTTGTATGAAGTTTAAGAAAAATATCG
 GGTTGGGCAACACATTCTATTTATTCATTTTATTTGAAATCTTAATGCCATCTCATGGTGTGGATTG
 GTGTGGCACTTTATTCTTTTGTGTGTGTATAACCATAAATTTATTTTGCATCAGATTGTCAATGTA
 TTGCATTAATTTAATAATATTTTTATTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 1)

Aminoácido de PD-L1 de ratón (Q9EP73)

MRIPAGHETACCHLLRA(FITAPKDLVYVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYVWEKEDEQVIQ
 FVAGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAAALQITDVKLQDAGVYCCHSYGGADYKRIT)LKVN
 APYRKINQRISVDPATSEHELICQAEQYPEAEVIWNTSDHQPVSQKRSVTTSRTEGMILLNVTSLLR
 VNATANDVFYCTFWRSQPCQNHAEHLPELPAHPFQNRTHWVLLGSILFLIVYSTVLLFLRQVR
 MLDVEKCGVEDTSSKNRNDTQFEET (SEQ ID NO:2)

ARNm de CD274 humano (NM_014143.3)

GGCCCAACGCTGAGCAGCTGGCGCGTCCCGCGCGGCCCCAGTTCTGCCGAGCTTCCCAGGCTCCG
 CACCAGCCGCGCTTCTGTCCGCTGCAGGGCATTCCAGAAAGATGAGGATATTTGCTGTCTTTAT
ATTTCATGACCTACTGGCATTTCCTGAACGCATTACTGTACCGGTCCCAAGGACCTATATGT
GGTAGAGTATGGTAGCAATATGACAATTGAATGCAAAATTCCCAGTAGAAAAACAATTAGACC
TGGCTGCACIAATTGTCTATTGGGAAATGGAGGATAAGAAACATTAATTTCATTTGTGCATGGAG
AGGAAGACCTGAAGGTTACGCATAGTAGCTACAGACAGAGGGGCCCGCTGTTGAAGGACCA
GCTCTCCCTGGGAAATGCTGCACCTCAGATCACAGATGTGAAATTCAGAGGATGCAGGGGTGT
ACCGCTGCATGATCAGCTATGGTGGTGCCGACTACAAGCGAATTACTGTGAAAGTCAATGCC
CCATACAAACAAAATCAACCAAGAAATTTTGGTTGTGGATCCAGTCACCTCTGAACAIGAACIG
ACATGTCAGGCTGAGGGCTACCCCAAGGCCGAAGTCATCTGGACAAGCAGIGACCATCAAGT
CCTGAGTGGTAAGACCACCACCACCAATTCCAAGAGAGAGGAGAAGCTTTTCAATGTGACCA
GCACACTGAGAATCAACACAACAATAATGAGATTTTCTACTGCACITTTAGGAGATTAGATC
CTGAGGAAAACCATACAGCTGAATTGGTCAATCCAGAACTACCTCTGGCACATCTCCAAAT
GAAAGGACTCACTTGGTAATTCTGGGAGCCATCTTATTATGCCCTGGGTGTAGCACTGACATTC
ATCTTCCGTTTAAGAAAAGGGAGAATGATGGATGTGAAAAAATGTGGCATCCAAGATACAAA
CTCAAAGAAGCAAAGTATACACATTGGAGGAGACGTAATCCAGCATTGGAACCTCTGATCTT
 CAAGCAGGGATCTCAACCTGTGGTTTAGGGGTTTCATCGGGGCTGAGCGTGACAAGAGGAAGGAA
 TGGGCCCCGTGGGATGCAGGCAATGTGGGACTTAAAGGCCCAAGCACTGAAAATGGAACTGGCG
 AAAGCAGAGGAGGAGAATGAAGAAAGATGGAGTCAAAACAGGAGCCTGGAGGGAGACCTTGATA
 CTTTCAAAATGCCCTGAGGGGCTCATEGACGCTGTGACAGGGAGAAAAGGATACTTCTGAACAAGGA
 GCCTCCAAGCAAAATCATCCATTGCTCATCTAGGAAGACGGGTTGAGAATCCCTAATTTGAGGGTC
 AGTTCTCGCAGAAGTGCCCTTCCCTCCACTCAATGCCICAATTTGTTTCTGCACTGACTGAGAGTC
 TCAGTGTGGAAACGGGACAGTATTTATGTATGAGTTTTCTTATTTATTTGAGTCTGTGAGGTCTTC
 TTGTCTATGTAGTGTGGTTGTGAATGATTTCTTTGAAGATATATTGTAAGTAGATGTTACAATTTTG
 TCGCCAAACTAAACTTGCTGCTTAATGATTTGCTCACATCTAGTAAAACATGGAGTATTTGTAAGGT
 GCTTGGTCTCCCTATAACTACAAGTATACATTGGAAGCATAAAGATCAAACCGTTGGTTGCATAG
 GATGTCACTTTATTTAACCCTTAATACTCTGGTTGACCTAATCTTATTCTCAGACCTCAAGTGICT
 GTGCAGTATCTGTTCCATTTAAATATCAGCTTTACAATTATGTGGTAGCCTACACACATAATCTCAT
 TTCATGCTGTAAACACCTGTTGTGATAAACCCTATTATTTTACCCATCGTACAGCTGAGGAAGCA
 AACAGATTAAGTAACCTTGCCCAAAACCAGTAAATAGCAGACCTCAGACTGCCACCCACTGTCTTTT
 ATAATACAATTTACAGCTATATTTTACTTTAAGCAATTCCTTTATTCAAAAACCATTTATTAAGTGC
 CCTTGCAATATCAATCCCTGTGCCAGGCATTGAATCTACAGATGTGAGCAAGACAAAAGTACCTGTC
 CTCAAGGAGCTCATAGTATAATGAGGAGATTAAACAAGAAAATGTATTATTACAATTTAGTCCAGTG
 TCATAGCATAAGGATGATGCCAGGGGAAAACCCGAGCAGTGTGCGCAAGAGGAGGAAATAGGCCA
 ATGTGGTCTGGGACGGTTGGATATACTTAAACATCTTAATAATCAGAGTAATTTTCATTTACAAAAG
 AGAGGTCCGTACTTAAATAAACCTGAAAAATAACACTGGAATTCCTTTCTAGCATTTATTTTATTT
 CCTGATTTGCCCTTGCCATATAATCTAATGCTTGTATATAGTGTCTGGTATTGTTAACAGTTCTG
 TCTTTCTATTTAAATGCCACTAAATTTTAAATTCATAOCTTTCCATGATTTCAAAATTCAAAAGATCC
 CATGGGAGATGGTTGGAAAATCTCCACTTCATCCTCCAAGCCATTCAAGTTTCCTTCCAGAAGCA

Figura 6 (continuación)

ACTGCTACTGCCCTTTCATTTCATATGTTCTCTCTAAAGATAGTCTACATTTGGAAATGTATGTTAAAAAG
CACGTATTTTTAAAAATTTTTTCTCTAAATAGTAACACATTGTATGCTGCTGTGACTTTGCTATTTT
TATTTATTTTAGTGTTCTTATATAGCAGATGGAATGAATTTGAAGTTCCAGGGCTGAGGATCCAT
GCTTCTTTTGTCTCTAAGTTATCTTTCCCATAGCTTTTCATTATCTTTCATATGATCCAGTATATGTA
AATATGCTCTACATATAACATTTAGACAACACCACATTTGTTAAGTATTTGCTCTAGGACAGAGTTTGG
ATTTGTTTATGTTTGTCTCAAAAGGAGACCCATGGGCTCTCCAGGGTGCAGTCAATCTAGTCTT
AAAAAGCAATCTTATTTAATTAACCTCTGTATGACAGAATCATGTCTGGAACCTTTTGTCTTCTGCTTCT
GTCAAGTATAAACTTCACCTTGATGCTGTACTTCCAAAATCACATTTTCTTTCTGGAAATTCGCGCA
GTGTACCTTGACTGCTAGCTACCCTGTGCCAGAAAAGCCTCATTGCTTGTGCTTGAACCTTGAATG
CCACCAGCTGTATCACTACACAGCCCTCCTAAGAGGCTTCTGGAGGTTTCCAGATTTCAGATGCC
CTGGGAGATCCCAGAGTTTCTTTCCCTCTTGGCCATATTCTGCTGTCAATGACAAGGAGTACCTTG
GCTTTGCCACATGTCAAGGCTGAAGAAACAGTGTCTCCAACAGAGCTCCTTGTGTTATCTGTTTGT
CATGTGCATTTGTACAGTAATTGGTGTGACAGTGTCTTTGTGTGAATTACAGGCAAGAATTGTGOC
TGAGCAAGGCACATAGTCTACTCAGTCTATTCTAAGTCTTAACCTCCTCTGTTGGTGTGGAATTTG
TAAGGCACCTTATCCCTTTTGTCTCATGTTTCATCGTAAATGGCATAGGCAGAGATGATACCTAATT
CTGCATTTGATGTCACTTTTGTACCTGCATTAATTTAATAAAATATTCTTATTTATTTTGTACTTG
GTACACCAGCATGTCCATTTCTGTTTATTTTGTGTTAATAAAATGTTCAAGTTAACATCCCAGTG
GAGAAAGTTAAAAA (SEQ ID NO:3)

Aminoácido de PD-L1 humano (Q9NZQ7)

MRIFAVFIEMTYWHLLNA(FTVTPKDLVYVVEYGSNMTHCKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNII
QFVHGEEDI.KVQHSSYRQRARLLKQDLSLGNAAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRIT)V
KYNAPYNKINQRILVYDPVISEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTNSKREEKLFNV
TSTLRINTFTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPFLAHPPNERTHLVILGAILLCLQVALTFIPRLAK
GRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET (SEQ ID NO:4)

ARNm de CD274 humanizado

GAAATCGTGGTCCCCAAGCCTCATGCCAGGCTGCACCTTGCAAGTCGCGGGCCAGTCTCCTCGCCTG
CAGATAGTTCCCAAAAACATGAGGATAFTTIGCTGGGCATTATATTCACAGCCTGCCTGCTACTTGGT
ACGGG(CATTTACTGTACCGTTCCCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTAGCAATATGA
CAATTGAATGCAAAATCCCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGCTGCACCTAATTGTCTATTGGG
AAATGGAGGATAAGAACATTATTCAATTTGTGCATGGAGAGGAAGACCTGAAGGTTGAGCAT
AGTAGCTACAGACAGAGGGCCCGGCTGTGTAAGGACCAGCTCTCCCTGGGAAATGCTGCACT
TCAGATCACAGATGTGAAATTCAGCATGCAGGGGTGTACCGCTGCATGATCAGCTATGGTG
GTGCCGACTACAAGCGAATTACTGTCAAAGTCAATGCCCCATACAACAAAATCAACCAAGA
ATTTGGTGTGTGGATCCAGTCACCTCTGAACATGAACTGACATGTCAAGGCTGAGGGCTACCC
CAAGGCCGAAGTCATCTGGACAAGCAGTGACCATCAAGTCTGAGTGGTAAGACCACCACCA
CCAATTCCAAGAGAGAGGAGAAAGCTTTCAATGTGACCAGCACACTGAGAATCAACACAACA
ACTAATGAGATTTCTACIGCACTTTTAGGAGATTACATCTGAGGAAAAACCATAACAGCTGAA
TGGCTCATCCCAAGAACTACCTCTGGCACATCTCCAAATGAAAGG)ACTCACTGGGTGCTTCT
GGGATCCATCTCTGTGTCTCTCATGTAGTGTCCAGGCTCCTCCTCTTCTTGAGAAAACAAGT
GAGAATGCTAGATGTGGAGAAATCTGGCGTTGAAGATACAAGCTCAAAAAACCGAAATGATA
CACAATTCGAGGAGACGTAAGCAGTGTGAAACCTCTGATCGTCGATTGGCAGCTTGTGGTCTGT
GAAAGAAAGGGCCCATGGGACATGAGTCCAAAGACTCAAGATGGAACCTGAAGGAGAGAAACCAA
GAAAGTGTTCGGAGAGGAGCCTGGGAACAACGGACATTTTTCCAGGGAGACACTGCTAAGCAAGT
TGCCCATCAGTCTCTTGGGAAATGGATTGAGGCTTCTGGCTTAGCAGCTGGTCTTGCACAGTG
ACCTTTCTCTGTCTCAGTGCCGGGATGAGAGATGGAGTCATGAGTGTGGAAGAATAAGTGCCCTC
TATTTATTTTGAAGTCTGTGTGTTCTCACTTTGGGCATGTAATTATGACTGGTGAATTCTGACGACAT
GATAGATCTTAAGATGTAGTCACCAAACTCAACTGCTGCTTAGCATCCTCCGTAACCTACTGATACA
AGCAGGGAACACAGAGGTACCTGCTTGGTTTGACAGGCTCTTGCTGTCTGACTCAAATAATCTTT
ATTTTTCAGTCTCAAGGCTCTTCGATAGCAGTTGTTCTGTATCAGCCTTATAGGTGTGAGGTATAG
CACTCAACATCTCATCTCATTACAATAGCAACCTCATCACCATAGCAACAGCTAACCTCTGTTATC
CTCACITCATAGCCAGGAAGCTGAGCGACTAAGTCACTTGCCACAGAGTATCAGCTCTCAGATTT

Figura 6 (continuación)

[illegible]

Aminoácido de PD-L1 humanizado

MRLEAGHETACCHLLRAIFVTVPKDLVVEYCGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDENHQF
VHGEEIDLKVQHSSYRQRARILLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVYKV
NAPYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWISSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLPNVTST
LRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTHWVLLGSILLFLVVSTVLLFLAEQFR
MLDVEKCGVEDTSSKNRNDTQFEET (SEQ ID NO:6)

Fragmento de humanización A

GTACACGGTTTCCCAAGGACCTATATGTGGTAGAGLATGGTAGCAATATGACAATTGAATGCAAATTC
CCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGCTGCACCTAATTGTCTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACATT
ATTCAATTTGTGCATGGAGAGGAAGACCTGAAGGTTTCAGCATAGTAGCTACAGACAGAGGGGCCCC
GCTGTTGAAGGACCAGCTCTCCCTGGGAAATGCTGCACCTTCAGATCACAGATGTGAAATTCACAGGA
TGCAGGGGTGTACCGCTGCATGATCAGCTATGTTGGTGGCGACTACAAGCGAATTACTGTGAAAGT
CAATGGTAAGAATTATTATAGATGAGAGGCCCTGATCTTTATTGAAAACATATTCCAAGTGTGGAAG
ACTTTTCATTTCTGTAAAGTCCATACTTATTTTCAAACAGAACAGCATAGTCTGTTCATTTCATTTC
AATTCATGAATTCATTCACATAAATTATCCAATTTCTTGAGCACCTATTTGATAGTCACTGGAAATCC
AGAGACAAAACAACACAGAGCCATGTTCTACAGTATGTACAGTTTTCCAAAAAGAATTTCTAGTCTT
TACTTTTTTATTACAAATGGAATACGTATACTTGCAAAATAATTCAGATACTGTGGAAGAGATCAAA
TGAATTTGCAAAAAGTGTCCCTCTCCCTTCAACCACTATCTCCCATGGCATGCAGAGAGAGTAACCATT
ATTGTGTGTCTCCCTCCAGAAATTTTTTATTCAACTACTATTTTATTATTAGGTCCGTCAAGTTT
TCCTTTTTTGAGCCTCTCTATATCAAAATGCAAAATAAATATATTACGAACAAACCCCACTGTAAGGTT
CACATTTAAAAAAGACTTGAAGTCAACCTATGAAGACAAAAAATAATCACATTAAGTGTGAAAGAA

Figura 6 (continuación)

CCTATTCTTCAGTACAGGATAAGCCATACTTACTGGGCATATATTATCTTTGAAAATCTATACTGA
 TGTGTCTTGGGGAATTGAAAAGGAACTAGGAGTGTAGTTCTCGGTATTGACCCACAGTTATGTT
 ATCAGGTCACCTTGAGTTCAAAGTTTTGTGTTGGCACTAGCTAAGTAAAGGAAAACACCTCTGCTTTC
 ATTGTTGAGTTTACAGAAATTGAGAGCTGAAAGGATCCCAGGCAGGAGCAGCTAATCCAACTCCC
 ACAAAGAACAATAATCCCCCAGAGGATCTTCTGTTCTTATATTTCCTGCAATGGCGTCCCTGTCATA
 TCCCACAATGGCCTCCCTGCCATTTGGATATCCCTTCCATATCCTGTTGAAATTAACCTCCTAATAGT
 AAGCTGAAATCTGCCCCCTCTAGTTGTAGTCTTGGGATTATTTCAATTTACATGATGACCTTTTAATATT
 TGACTAGAATTAATCATCTCCCTTGGTCTTTCCATTCCTGGGCTAACTACCATCAATCTGAGGGC
 TAACAATACAAGTAGAAAAAGTATACATTTGTCACTGATCACTGATCAATTATTAATCAATGATCA
 CTGATAACTATAAACTCAAAAACAAAATCATGTGGGGATTAAAGAGAAATGTATCAGTTTTATGTTG
 TATTTCTGGTCCCTGATACTGGCTCAGGTAATGCCACTATTGTCAAGAAGATACCACTTGTAAAGTA
 GATTTAATTTTCATTATATTTTACCATATGCTTCTCCATTCAATGACATCTCTTGAGATGTTGTGTTT
 ATACTTTCAGTTTTTCTCCAGTCCATCCGCAATAATCAGGCATCTACTGTGTTCCAAAGATATTAAG
 AAATCATCATGACTTAGCCTCATCAACAGCATTTGCTAGATCTGGGATGGAAAGGAAGAGTATAATC
 CTGGCAGTCAGGAAGAAGGCAGCATAAAGTATAAGTTTCTGCTTCCAAAAAGGTCTCTCATCAGC
 CTGTAGGGAGTGTGTAGGGAAGGGACAGCTGTCTTGTAGTAGGGGAAGGGTTTTATTCAAGGTCTC
 TGGGCTCCATAATATECCCTTGTGTATCTGCAGTCTCCTTTGCCATGGATCAACACAATAGGAAATCT
 TOCGGCACTGATGGTTTTTCCAAGGGGGAGTTCTTCTGGAGCAAAAGCAAATGACCAACCAGGTTT
 GAGGACCTGATTTGTTTGACAATTCATTTTGTATGTAAATTAATTAATTGGCATTCTACTCCCAAT
 CCATCTTGTCTTTGCATACAGTGGTTTTGGGATTGAGTTCAGCTATACCAAAAGTCTGAACCTTCT
 GCACCTAGAACAAGGCAACCACCAAGCTTCACTTGCCTGAGGCGGTGTCTCCAATGGAAATGAGG
 CAGCTGGCTTGCAGGAGCTTCCCAACTCAGGGAAGTAGAACTCCTGAGTCACCTCCATATGCAAAAT
 GATTTACAGTAATGCTGTTGAACCTTCACTTCCCATCACAACAAATGTGTGGTAACATAGCTTCCCC
 ACAGGAGTTTACTCACCATGGTATTTTTAAAGGTGAAACATTTCAAAAAGTAAATTTGAAAGAATTT
 AGTTTTGGATTCACTCAATTATCACTATCACTTCCGGGTGTTATTCACCTTTCTTGTGTTGTGAGTTA
 AATGCCAGACTCTCAGGCCACTAACTTTCAATTAAGGTGTTTTCTTTAATCGCTGAAECTAACAG
 CAGGGAACCAAGAAATGTTTCATTTCAGACTTTTCAAACTTCAATGAGATTAGGCAGCTGAAAGATCA
 AAGTGTGTCATAGTTGTCCCGATAAAGCTATTTGGATCATATGGACCAAAATCGACTGCTGTCTATCC
 CCACCAACCCCATCTCTCCCAAAATTTCCAGCCCTGTTTAAAGTGTCTCTGTAGCATTTATCTCTAT
 CTAGTATAATGTGTAGCATATCATATCATACTTTCTGTTTTGTTTTATTGTCTCTCTCTCTCTAGAAAT
 ATAACTCCACAAGCACAAAGATTTGGGCTGTTTTATAATAATTGTTGCATCCCCAGGGCCTGATAT
 ACAGCAGAGTGGTGGTACGAAAAGAGCACAAAAAATATTTGTTGAGTCAATGAATGAATGAT
 TTCTCAAAATAGGATTAGCTAAAATTTTGGAAACATGAACAGATTGGGATATGTGAAAATTTATTT
 CCAGACTGTTTCATCAGGAACGTGTAGCAGCTTCTAAAGGGTACACTGGAGCAGCAGTAGTAAAAAG
 GAGGAAGAGGAGCAGCTCTGCTACTGCTACTATCGAGTACTACTACAATTAGCAGCTTGTCTATTCT
 GTGTGTTAGGCCCTGTACTGAACACTCTGTCTAAATTAGTTTCATTTCTCTCTGGAAATGACTCTAGG
 GGTAAGTGCTTCATCATGTAAGATGAGTATTTTTCACATTTTGTGTTGTCTGAAATCTGAGTGTGT
 CTTTCAATGATGGAATCTTTGATTCCATGATAAGTGGTATTATTCCCATTTTAAAGGATGAGGAACT
 GAGGTCCAAAGAAATTAAGTAATTTGCCCAAAATTCACCCAGCCTAGAAAATGATAAAGCTAGTTCT
 AAACCCAGCAGATTAGCTCTGAAGTCTGGGCCCTTAATAACCACTTTTTATTGCCATATTTGTAC
 CTCTGGTGTACGTATCAAGTTATATGTTGACTTCAAACTATCATGACCTTTTCTTGGTTTTGTATGT
 CCAACATTAGTATAGTGTCTTGGGTCTGCAAAAATTTTGATTACTCATCTCATCTGTAAAAACATTTT
 GAACTCGTGTGTTTGTGTCATGCACATTTGTGTGTAATTATAAAAAATTTTACTTTCTGTTAATATATA
 AGTTGTATCATAAGAAAAGTCCCGTTTTTGAAGAGCAAAAAAAGGTTGAATGTTACCAGTTACATCT
 GGTTCAACTAATAGACATTTGTACAAAAACAGACATTTTAAAGAGGTTGAAATAAAAAATTTAATAA
 ACAATATTTTCACTTTTACTAATTTGTGATGCTTCACTATCATTAGCTAATATGTCAAGGCATAATA
 TACCTTAGGGTGAACCTTATCATTAACAAAGGTGGATGGTGTCAATAATCTTGAGGTTTTGTGTTTT
 TTATATAACACTGCGAGGTCTAATTAAGTACTTACTGTTTACCACTCATACAGTGGCCGATAAAA
 AGTGTCACTTCTGCTGTTTCTCTGGGTGTGCTTGAATTATTAGTATTATCTTCAGTCTCAGTTCT
 TTTGTGGGAAACTTTTTAATTAGTTGTTTAAATTTTGAAGATGGTTAGTTTAGTCAAAATTAGATAA
 GAGAAATTTGAAAATCCGTAGCTACCCCAAGCAACCTACACATAAGAACTATTATTTTGTGTTTTG
 AAATCATAATTTTATTTGATTTCCAGTGTTCCTACTGGTGTGTTTTCATTGATATAGGAGTATCAAA
 ACATCACTCATTATTTATTTTCAAGTTTCATTGATCCTAGCCGTTTTGTATTAATCTCTGTGAAGAAA

Figura 6 (continuación)

TTACCTCACAAATCTATTGCTGTGCTAGCTCGCTACCTTAGGACCGTATAGTTACTAGCATAACT
 TCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATTCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAA
 CCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGT
 AACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTTCATTTTATGTTTCAGGTTCA
 GGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAGATGTGATATGGCTGATTATGA
 TCATTACTTATCTAGAGCTTAGATCCCCCTGCCCGGTATTATTATTTTTGACACCAGACCAACTG
 GTAATGGTGGGAGGACCGCTCAGCTGGAATTTGCCCGCAACTAGGGCAGGTTTAAACAACAACAT
 TGCATTTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCT
 ACAGATGTGATATGGCTGATTATGATCATTACTTATCTAGATCAATCGCCATCTTCCAGCAGGGCGCA
 CCATTGCCCTGTTTCACTATCCAGGTTACGGATATAGTTTCATGACAAATATTTACATTGGTCCAGCC
 ACCAGCTTGCATGATCTCCGGTATTGAACTCCAGCGCGGGGCATATCTCGCGCGGCTCCGACACG
 GGCACCTGTGTCCAGACCAGGCCAGGTATCTCTGACCAGAGTCATCCTAAAATACACAACAATTAG
 AATCAGTAGTTTTAACACATTATACACTTAAAAATTTTATATTTACCTTAGCGCCGTAAATCAATCGA
 TGAGTTGCTTCAAAAATCCCTTCCAGGGCGCGAGTTGATAGCTGGCTGGTGCGCAGATGGCGCGGCA
 ACACCATTTTTCTGACCCGGCAAAAACAGGTAGTTATTCGGATCATCAGCTACACCAGAGACGGAA
 ATCCATCGCTCGACCAGTTTAGTTACCCCCAGGCTAAGTGCCCTCTCTACACCTGCGGTGCTAACCA
 GCGTTTTCTGTTCTGCCAATATGGATTAAACATTCTCCACCGTCAGTACGTGAGATATCTTTAAACCT
 GATCCTGGCAATTTCCGGCTATACGTAACAGGGTGTATAAGCAATCCCCAGAAATGCCAGATTACG
 TATATCCTGGCAGCGATCACTATTTTCCATGAGTGAACGAACCTGGTCCGAAATCAGTGGCTTCGAA
 CGCTAGAGCCTGTTTTGCACGTTCAACCGGCATCAACGTTTTCTTTTCGGATCCGCCGCATAACCAGT
 GAAACAGCATTTGCTGTCACTTGGTGTGGCAQCCCGACCGACGATGAAGCATGTTTAGCTGGCCC
 AAATGTTGCTGGATAGTTTTTACTGCCAGACCGCGCGCCTGAAGATATAGAAGATAATCGCGAACA
 TCTTCAGGTTCTGCGGGAAACCATTTCCGGTTATTCAACTTGCCACCATGCCGCCACGACCGGCAA
 ACGGACAGAAGCATTTTCCAGGTATGCTCAGAAAAACGCTGGCGATCCCTGAACATGTCCATCAGG
 TTCTTGCGAACCTCATCACTCGTTGCACTCGACCGGTAATGCAGGCAAATTTGGTGTACGGTCAGTA
 AATTGGAATTTAAATCGGTACGCACCTTCTCTTCTTCTTGGGGGTACCCATGGTGTGGCTTGGCC
 GGGAGCTGGCTCAGAGCAGGGGACACACACCTGGGTGAGGCCAGCCAACTGTGAGCAGGTGGAAT
 TTTGTGGGCTGTGGCTGGGAGCCAGCACCTCTTCTCTTATAGATACTAGTGGCCCTAGGAATT
 ATGAAGTCAAAGAGGACCAGGACCTCAGAGACCATGGCCAGTGAGGACCTGTACCATGTCCAAAT
 ATGGGCATGAGAGGGGTGGGCAGGGCTTTGGCATCAGGAGTTGCTTGTGTCACAGTCAAGAAGTG
 ACAAAGATGGCATCCACTTGAGTGTTCACTTAGTCACTCAGCTTAGGTGTTAAGTGCCACACACCT
 GCTTCTAGGCTAGGTCTGATAGATAAOCOAAGGCCAGGCAGGTGGGTGAAACAGCCACATGGAT
 TTGAACGTGAAAAGCACACATCTTCAGACTGCTCAGAGAATGCTGCTGAGGGAACTTGACCTTTT
 AAGAAATTATCCAACGCCCCAGTGAGGCACTGACAGACAAATCCAGAGGGTCTCAGAGTTGCAGG
 GGGGTGGGCTCTAGTAAAACATTGAGGCCCCATCAAGTGCTTCAGGTATAAATGGGAGCCACATG
 GATGCAGAGCAGTGTGTTGACTGAGGGAGGTGTTGGACATTACTAGACAGAAGGTGGACGTGGGT
 GCTGCTACTGGCGCCCGGGCTAGGGGCTGCAGGTGAGGTCTGATGGAATTAGAATTTGGCAAAA
 CAATACTGAGAATGAAGTGATGTGGAACAGAGGCTGCTGATCTCGTTCTTCAGGCTATGAACTG
 ACACATTTGGAAACCACAGTACTTAGAACCACAAAGTGGGAATCAAGAGAAAAACAATGATCCCA
 CGAGAGATCTATAGATCTATAGATCATGAGTGGGAGGAATGAGCTGGCCCTTAATTTGGTTTTGCT
 TGTTTAAATATGATATCCAACATATGAAACATTATCATAAAGCAATAGTAAAGAGCCCTTCAGTAAA
 GAGCAGGCATTTATCTAATCCCAACCCACCCCAACCCCGTAGCTCCAATCCTTCCATTCAAAATGT
 AGGTACTCTGTTCTCACCTTCTTAAACAAGTATGACAGGAAAAACTTCCATTTTAGTGGACATCTT
 TATTGTTTAAATAGATCATCAATTTCTGCAGACTTACAGCGGATCCCTCAGAAGAACTCGTCAAGA
 AGCCGATAGAAGGGGATGCGCTGCCAATCGGAGCGGGGATACCGTAAAGCACAGGGAAGCGGT
 CAGCCCATTCGCCCCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAAAGCTATGTCTGATAGCGGT
 CCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCTG
 GCAAGCAGGCATGCGCATGGGTCAAGACGAGATCATCGCCGTGGGGCATGCGCGCTTGAAGCTG
 GCGAACAGTTTCGGCTGGCGCGAGCCCCGATGCTCTTTCGTCCAGATCATCTGATCGACAAGACCG
 GCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTGAATGGGCAGGTAGCC
 GGATCAAGCGTATGCAGCCGCCCGCATTCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGG
 TGAGATGACAGGAGATCCTGCCCGGCCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAAGT
 ACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCTGTGCCAGCCACGATAGCCCGCTGCTC

Figura 6 (continuación)

GTCTGTCAGTTTCATTCAGGGCACCGGACAGGTCTGTCGTTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGC
 TGACAGCCGGAACACCGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAG
 CCTCTCCACCCAAAGCGGCGGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCAAATGGCCGATCCCATGGT
 TTAGTTCCTCACCTTGTCTGTTATTATACTATGCCGATATACTATGCCGATGATTAAATTGTCAACACGT
 CTAACAAAAAAGCCAAAAACGGCCAGAAATTTAGCGGACAAATTTACTAGTCTAACACTGAAAAATTA
 CATATTGACCCAAATGATTACATTTCAAAAAGGTGCCTAAAAAACTTCACAAAAACACACTCGCCAAAC
 CCCGAGCGCATAGTTCAAAAACCGGAGCTTTCAGCTACTTAAGAAGATAGGTACATAAAAACCGACCA
 AAGAAACTGACGCTCACTTATCCCTCCCTCACCCAGAGGTCCGGCGCCTGTCTGATTTCAGGAGAGC
 CTACCCTAGGCCCCGAACCCCTGCGTCTGCGACGGAGAAAAAGCCTACCGCACACCTACCGGCAGGTG
 GCCCCAOCCTGCATTATAAGCCAAACAGAACGGGTGACGTCAAGACACGACGAGGGGCGGCGCTCC
 CAAAGGTACGGGTGCACTGCCCAACGGCACCGCCATAAATGCGCGCCCCCGCAACAGACGACAAAC
 CGAGTTCTCCAGTCAGTGACAAACTTCACGTCAAGGTCCCCAGATGGTGGCCAGCCCCATCTCACC
 CGAATAAGAGCTTTCCCGCAATTAGCGAAGGGCTCAAGACCTTGGGTTCTTGCGCGCCACCATGCC
 CCCAECTTGTTTCAACGACCTCACAGCCCGCTCACAAAGCGTCTTCCATTCAAGACTCGGGAACAG
 CCGCCATTTTGTGCGCTCCCCCAACCCAGTTTCAGGGCAACCTTGTCTCGCGGACCCAGACTAC
 AGCCCTTGGCGGTCTCTCCACACCGCTTCCGTCCACCCGAGCGGCGCGGCCACGAAAGCCCCGG
 CCAGCCCCAGCAGCCCGCTACTCACCAGTGACGATCACAGCGATCCACAAACAAAGAACCGCGACC
 CAAATCCCGGCTGCGACCGAACTAGCTGTGCCACACCCGGCGCGTCTTATATAATCATCGGCGTT
 CACCGCCCCACGGAGATCCCTCCCGCAGAAATCGCCGAGAAAGGGACTACTTTCTCTCGCCTGTTCGGC
 TCTCTGGAAAGAAACCAAGTGGCTTAGAGTCACCCAAGTCCCGTCTTAAATGTCTTCTGCTGAT
 ACTGGGGTTCTAAGGCCGAGTCTTATGAGCAGCGGGCGCTGTCTGAGCGTCCGGGGCGGAAGGAT
 CAGGACGCTCGCTGCGCCCTTCGTCTGACGTGGCAGCGCTCGCCGTGAGGAGGGGGCGCCCGCG
 GGAGGCGCCAAAACCCGGCGCGGAGGCCATGCATATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTT
 ATCTCGAGCTTGGTAAAGGAATGGAGAATTAAGGCTCTAGATCATTAGTGGTTACACTATAGTATT
 AGAAGTAAAAAAGATTATACCAACAAAAATAAGAACATGTTAATGTACTTGTAAATGAATAAACA
 TGAATAAAGCTCTTATGCTATATAGGTGCACTAAACAATCTACTAGAATTGTTCAGCAAACTACGTA
 TCTTAATCTGAAAGGGTCCCAACCAATGATCTAAAATTGAATCAAACCTTCTCTCTGAGCATAA
 TTACTTAAATGATTTATTAAAAATAGCCAGCATTTAAAAGCTTAAATGTAAATATCATAAATGTGGT
 ATCTAGATAGCATCCAGAACAGAAAAAGGATATTAGGGAAAAAAGTGGAGGAATGGAATAAATT
 ATGCAGTTTACTTATTAATAATGTACTAACGTCTTACTTATGACGATTGTACCATGGTAATGTAAAG
 ATACTAACAAATAGAGGAAACCCGGTAAGGAGTATACAGTAACTCTATACTATCTTTGCAACTTTTT
 TGTAAATTTAAACTTCTAAAAATAAGAACAAATTTAAACATTAAAAAGTATCACCAGGAACATAT
 ATCACTGTTTACAGATGAAATACTATGTATTTTCATATCTAATTTCTGATCATTGACTTCAAATCAG
 AAAAGTGAATGACACCTCAAATCAGGTTTTCTGTTTACTGAAGTCTAAGAAAAGAAAGCATACCA
 GCTGGAGAGATTTCATGTTTATAAAGACAGATTTATAACAACAAAAATAAAATATCCAAGAATAAA
 TTTAAGAAGAAGCACTTTACTGAGAAACATATGAAAACCTGAACAAATGGAGAGGGATATTTTGT
 ATTTGAATAGAAAGACTTCTGGTTTAAAGATAATTCTCTTTAAATTAATTTTTTGTAGAAATTTAAGG
 GGTACAAGAGCAGTGTTTGTACATGGATATATTACATAGTGGTGAAGTCTGGGGTTTTAGTGTA
 TTAATCTTTACATTTTGTGAGCCCAATAAATGTACCAACATGATTTTATAGAAAGATAGTCATT
 CCTATTAAATCCAACTTGTCCCACTTTGAATTGAATTGAGGCAGAGCTAGCAGGTGTTCCCCACG
 GCTGAGGCATCTGAACATTAAGCATATCCCTCTGAGAACCCAGCCTGCATTGATACTTTTCTAATGT
 GGACAGCATCAAGCTATGTACGTAGTTCTGTGCTCAGCAAAAGCCCTGACTTCTTTTGTGTTATGTC
 CTAGCCCCATACACAAAAATCAACCAAAAGTAATTTGGTTGTGGATCCAGTCACCTCTGAACATGAA
 CTGACATGTCAAGGCTGAGGGCTACCCCAAGGCCGAAGTCATCTGGACAAGCAGTGACCATCAAGT
 CCTGAGTGGTAAGACCACCACCACCAATTTCCAAGAGAGAGGAGAAAGCTTTTCAATGTGACCAGCA
 CACTGAGAATCAACACAACAATAATGAGATTTTCTACTGCACTTTTAGGAGATTAGATCCTGAGG
 AAAACCATACAGCTGAATTGGTCAATCCAGGTAATATTCTGAATGTGTCCATTAAAAATATGTCTAA
 CACTGTCCCTAGCACCTAGCATGATGTCTGCTATCATAGTCATTTCAGTGATTGTTGAATAAATGA
 ATGAATGAATAACACTATGTTTACAAAAATATATCCTAATTCCTCACCTCCATTTCATCCAAACCATAT
 TGTACTTAAATAAACATTCAGCAGATATTTATGGAATATACCTTTTGTTCATGCAATTGTAGTACTC
 ATTGGATACACATAGAATAATAAGACTCAGTTCACACTCTTCAGGAAACAGATAAAAAACTAAGA
 AACAAACAAAAAAGGCAATCCAAACACCATGTGGGAAATGCTTTTCATAGCCGGGAAACCTGGGG
 AATACCTGAGAGGAATACTCAATTACGGCTTGTTCAGGAATCCAAATCCTGGCACATCAGAGCT

Figura 6 (continuación)

GCTTCCCTCTTTCCAGGGTGGCAGGAAATAAATGGAACATATTTTCTATCTTATGCCAAACATGAG
 GGACCCCTTTCTCCCGGTGCTCTCCCAAGGTAGTCTACAATATTTCAACTCTAGCAGTCTGCTTAG
 TGCATAGAACATGAGGCTGTGTGTCCTGGGCAAATTACTAGACTTCTGTGTGCTTCACTTTCCCTG
 TAGGATTATAATCTACTGAGCAAGCTTATTGTAAGGGTCAGATTAGCAACAGTGTATGAAAATGAT
 TTGAGACCATTGCCTGCACAAATTCAACTATTTTTTTTTTATCTCACTACTCTACAGAAGTAGGTAGG
 GTGGGAGACAGAGTCTGATGAGAGGCTCAGAATGTGAAAGAAAGTGAGGGCGAAGTGAAGCATGATAT
 TTAATATAAACACAAAGATATTCTGAGAAGAGCTGCTCACTGCCCOCTCCCCCAATACATGTTGAT
 AGGAAAAATGCCACGTACTTCAGCAAAAAACAACCTGAAAAATTAGATAGAAAAAGTCAATCAATAGGA
 AAAGATAATCCAGGACGGTGTGTGTAACAGAAAGAGGGGGGAAAAAAGCTTTAGAAAAATGATGGGG
 ATGCTCTTACTGGGGTACGAGTCTCAGGGTATTGAACTGGCTTTTCAAGTAAAAGCTAGATTAGTGGG
 TTCTTGCCATTTACAAGCTGTTTTATGACAACCTTACTTGTGGGTGGCCTACAGTAACTCACCTAAC
 TGCCTGAGTCTGTTTCTCATCTGTAAATTTGGGGATTTTTTTTTAAATACCTGGCATGCCCTAACTCA
 TAAAGTTGTTCTGAAACTGAAATAAAACATACGTGAACAGGCATTGTAACTGTAAAGTTACGGAAA
 AAGCTGGCTGTTGTTGTGTCTTTAAAGTTTCACTGGGTAGTCAAAGATGGATCATGGGTCTCAGTG
 GAGAGCTGAGCCAGGCAGGAGCTGACTAAGGCTGAGAGGTGGGAGTTAGCAGCCTCTGAACATCT
 GTGTACCATGGGACCCCTTTCTCTGCTGATGTTACCCAGACAAGGAGCCTAGTAAGAGATACTA
 ATGGCTTGTGTGTCAGAGATGTTCAAACCTGCAGAGAAAGATAAGACAACAAGCATGGCTTCCCAAT
 CATGATGACAGATAGGAGGAGGTGGGAGCTCTTACGAGTGTGTGGTTGGCCTTCCATGTTCTACTG
 TGGGCCATCTCTGCCATGTACTGTAGGCTACTAGCTTCTATATTAAAGAATGCAAGAGGGGCCAGG
 AGCGGAGGCTCATGCCGTGAATCTCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGTGGGCAGATCACTTGAGGTCA
 GGAGTTTGTGACCGCTGGCCAACATGGTGAAACTCTGCTTTTACTAAAAATATAAAAAATTAGCT
 GGGTGTGGTGGTGTGCACCTGTAATCCCAGCTACTCGGGAGACTGAGGCACAAGAATTGCTTGAAC
 CTGGGAGGCGGAAGTTGCAGTGAGCCAGATTGGGCCACTGCCTCCACCTGGGCAACAGAGAA
 AGACTCTGCCCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAAGAGGAAGTGAAATAATCAAGGCCGCCATTAA
 TAGTGAGCAGCCACTCCATGTGGTACTGTGCAAGCACATTATAAATATTAGCCTCACAGAAATGT
 ATTAGCAFTTGTATTTTGTACACTGGTTAAGTATCTTGGCCCAAGACCTCAAAAAGCTGGTTAAGGGCAG
 CAGAATTTAGCCCCAGCACCACTTTTCAAAGCCTGGGCTTCTCACACTTCTCCATGCTGTTCCCAT
 TTTAACACAGGTATCTGGCCATTCCAGCCACTCAAACTTTGGCATTTAAGAAAAATTATCCTAAAGCT
 AAACATAACTTCAAGGATGACCATCTCTGACCCCTTCCCATCAAAATTTTATCTTTAGTCAGTTT
 GTTTTCGTTTTGTTTTGTTTTTCAGAACTACCTCTGGCACATCCTCCAAATGAAAGG (SEQ ID NO:7)

Fragmento de humanización B

GTCACGGTCCCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTAGCAATATGACAATTGAATGCAAATTC
 CCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGCTGCCTAATTGTCTATGGGAAATGGAGGATAAGAACATT
 ATTCAATTTGTGCATGGAGAGGAAGACCTGAAGGTTTCAAGCATAGTAGCTACAGACAGAGGGCCCG
 GCTGTTGAAGGACCAGCTCTCCCTGGGAAATGCTGCCTTCAAGTACAGATGTGAAATGCAAGGA
 TGCAGGGGTGTACCCCTGCATGATCAGCTATGGTGGTGCCGACTACAAGCGAATTACTGTGAAAGT
 CAATGGTAAGAAATTATTATAGATGAGAGGCCGTGATCTTTATTGAAAACATATCCCAAGTGTGAAAG
 ACTTTTCATTTCTTGTAAAGTCCATACTTATTTTCAAACAGAACAGCATAGTCTGTTTATTTCATTTC
 AATTTCATGAATTCATTACATAATTATCCAATTTCTTGAGCACCTATTTGATAGTCACTGGAATCC
 AGAGACAAACAACACAGAGCCATGTTCTACAGTATGTACAGTTTCCAAAAAGAATTTCTAGTCTT
 TACTTTTTTATTACAAATGGAATACGTATACTTGCAAAATAATTCAGATACTGTGGAAGAGATCAAA
 TGAATTGCAAAAGTGTCCCTCCTCCCTTCAACCACTATCTCCCATGGCATGCAGAGAGAGTAACCAT
 ATTTGTGTGTCCCTCCAGAAATTTTTTTTATTCAACTACTATTTTTTTTATTATTAGGTCCGTCAGTTT
 TCCTTTTTTGAGCCCTCTCTATAATCAAAATGCAAAATAATATATTCAGAACAAACCCCACTGTAAAGTT
 CACATTAAGAAAGACTTGAAGTCACCCCTATGAAGACAAAAAATAATCACATTAAGTGTGAAAGAA
 CCTATTCTTCCAGTACAGGATAAGCCATACTTACTGGGCATATATTCACTTGAAAAATCTATACTGA
 TGTGTCTTGGGGAATTGAAAAGGAACCTAGGAGTGTAGTTCCTCGGTATGACCCACAGTTATGTT
 ATCAGGTCACTTGAGTTCAAAGTTTTGTGTGGCACTAGCTAAGTAAAGGAAAAACACCTCTGCTTTC
 ATTGTTGAGTTTACAGAAATTGAGAGCTGAAAGGATCCAGGCAGGAGCAGCTAATCCAAACTCCC
 ACAAGAAACAAAAATCCCCAGAGGATCTTCTGTTCCTTATATTTTCTGCAATGGGGTCCCTGTCAFA
 TCCACAAATGGCCTCCTGCCATTTGGATATCCCTTCCATATCCTGTTGAAATTAATCCCTAATAGT
 AAGCTGAAATCTGCCCTCTAGTTGTAGTCTTGGGATTTATTTCAATTAACATGATGACCTTTTAATATT

Figura 6 (continuación)

TGA CTAGA ATTA AATCATCTCCCTTGGTCTTTCCATTCCTGGGCTAACTACCATCAATCTGAGGGC
 TAACAATACAAGTAGAAAAAGTATACATTTGTCACCTGATCACTGATCAATTATTAATCAATGATCA
 CTGATAACTATAAACTCAAAAACAAAATCATGTGGGGATTAAAGAGAAATGTATCAGTTTTATGTTG
 TATTTCTGGTCCCTGATACTGGCTCAGGTAATGCCACTATTGTCAAGAAAGATACCACCTTGIAAAGTA
 GATTTAATTTTCATTATATTTTACCATATGCTTCTCCATTCATGACATCTCTTGAGATGTTGTGGTTT
 ATACTTTTCAGTTTTTCTCCAGTCCATCCGCAAAATATCAGGCCATCTACTGTGTTCCAAGATAATTAAG
 AAATCATCATGACTTAGCCTCATCAACAGCATTGCTAGATCTGGGATGGAAAGGAAGAGTATAATC
 CTGGCAGTCAGGAAGAAGGCAGCATAAAGTATAAGTTTCTGCTTCCAAAAAAGGTCTCTCATCAGC
 CTGTAGGGAGTGTGTAGGGAAAGGGACAGCTGTCTTGTAGTAGGGAAAGGGTTTTATTTCAGGTCGTC
 TGGGCTCCATAATATCCCTTGTGTATCTGCAGTCTCCTTTGCCATGGATCAACACAATAGGAAATCT
 TCCGGCACTGATGGTTTTTCCAAGGGGGAGTTCTTCTGGAGCAAAAGCAAAATGACCAACCAGGTTT
 GAGGACCTGATTTGTGTGACAATTCATTTTGTATTGTAAATTACTTAATTGGCATTCTACTCCCAAT
 CCATCTTGTCTATTGTGCATACAGTGGTTTTGGGATTGAGTTCAGCTATACCAAAAAGTCTGAACCTTCT
 GCATTTAGAACAAGGCAACCAAGCTTCACTTGCACTGAGGCCGTGTCTCCAATGGAAATGAGG
 CAGCTGGCTTGCAGGAGCTTCCCAACTCAGGGAAGTAGAACTCCTGAGTCACCTCCATATGCAAAAT
 GATTTACAGTAATGCTGTTGAACCTTCACCTTCCCATCACAGCAAAATGTGTGGTAACATAGCTTCCCC
 ACAGGAGTTTACTCACCATGGTATTTTAAAGGTGAAACATTTCAAAACTGAAATTTGAAAGAATTT
 AGTTTTGGATTCACTCAATTATCACTATCACTTCCGGTGTATTGTCACCTTTCTTGTGTGTGAGTTTA
 AATGCCAGACTCTCAGGCCACTAACTTTCAATTAAGAGTGTTTTTCTTTAATGGCTGAACCTAACAG
 CAGGGAAAACGAAATGTTTCATTTCAGACTTTCAGAACTTCAATGAGATTAGGCAGCTGAAAGATCA
 AAGTGTGTGCATAGTTGTCCCGATAAAGCTATTTGGATCATATGGACCAAAATCGACTGCTGTCTATCC
 CCACCAACCCCATCTCTCCCCAAAAATTCAGCCCTGTTTTAAGTGTCTCTGTAGCATTTATCTCTAT
 CTAGTATATTTGTGTAACATATCATATCATACTTTTCTGTTTTGTTTTATTGTCTCTCTCCTCTAGAAAT
 ATAAACTCCACAAGCACAAAGATTTGGGCCCTGTTTTATAATATTGTTGCATCCCCAGGCCCTGATAT
 ACAGCAGAGTGGTGGTACGAAAAGAGCACACAAAAAAATATTGTTGAGTCAATGAATGAATGAT
 TTCTCAAAATAGGATTAGCCTAAAAATTTGGAAACATGAACAGATTGGGATATGTGAAAATTTATTT
 CCAGACTGTTTCATCAGGAAGCTGTAGCAGCTTCTAAAGGGTACACTGGAGCAGCAGTAGTAAAAAG
 GAGGAAGAGGAGCAGCTCTGCTACTGCTACTTATCGAGTACTACTACAATTAGCATTGCTTATTCT
 GTGTGTTAGGCCCTGTACTGAACACTCTGTCTAAATTAGTTTCATTTCTCTGGAAATGACTCTAGG
 GGGTAAGTGTCTTCATCATGTAAAGATGAGTATTTTTACATTTTTGTTGTGTCTGAAATCTGAGTGTGT
 CTTTCAATGATGGAATCTTTGATTCCATGATAAGTGGTATTATTCCCATTTTAAGGATGAGGAAACT
 GAGGTCCAAAGAAATTAAGTAATTTGCCCAAAATTCACCCAGCCTAGAAAATGATAAAGCTAGTTCT
 AAACCCAAGCAGATTAGCTCTGAAGTCTGGGCCCTTAATAACCACTTTTTATTGCCATATTTGTAC
 CTCTGGTGTACGTATCAAGTTATATGTTGACTTCAAAACTATCATGACCTTTTCTTGGTTTTGATTGT
 CCAACATAGTATAGTGTCTGGTCTGCAAAAAATTTGATTACTCATCTCATCTGTAAAACATTTT
 GAACTCGTGTGTTTTGTGCATGCACATTTGTGTGTAATTAATAAAAAATTTACTTTCTGTTAATATAA
 AGTTGTATCATAAGAAACTGCCGTTTTTGAAGAGCAAAAAAAGGTTGAATGTTACCAGTTACATCT
 GGTTCACCTAATAGACATTTGTACAAAAACAGACATTTTAAGAGGTTGAAATAAAAAATTTAATAA
 ACAATATTTTCAGTTTTTACTAATTTGTGATGCTTCACTATCATTAGCTAATATGTCAAGGCATAATA
 TACCTTAGGGTGAACCTTATCATTAAACAAAGGTGGATGGTGTCAATAATCTTGAGGTTTGTGTTTT
 TTATATAACACTGCGAGGTTCTAATTAAGTACTTACTGTTTACCACCTCATACAGTGGCCGATAAAA
 AGTGTCACTTCTGTGTTTTCTCTGGGTTGTGCTTGAATTAATTAGTATTATCTTCACTCCTCAGTTTC
 TTTGTGGGAAACTTTTTAATFAGTTGTTTTAATTTTGTAAAGATGGTATGTTTACTCAAAATTAGATAA
 GAGAATTTGAAAAATCCGTAGCTACCCCAAGCAACCTACACATAAGAACTATTATTTTTGTGTTTTG
 AAATCATAAATTTTATGATTTCAGTGTTCCTACTGGTATGTTTCAATGATATAGGAGTATCAAA
 ACATCACATCATTATTTATTTTCAGTTTTCATTTGATCCTAGCCGTTTTGTATTAACTCTCTGTGAAGAAA
 TTACCTCACAAATCTATTGCTGTCCCTAGCTCCGTACCTTAGGACCGTTATAGTTACTAGCATAACT
 TCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTCGAGCTTGGTAAAGGAATGGAGAATTAAGGCTCTAG
 ATCATTAGTGGTTACACTATAGTATTAGAAGTAAAAAAAGATTATACCAACAAAAATAAGAACAT
 GTTAATGTACTTGTAAATGAATAAACATGAATAAAGCTCTTATGCTATATAGGTGCACTAAACAATC
 TACTAGAATTGTGACGAAACTACGTATCTTAATCCTGAAAGGGTCCCAAAACCAATGATCTAAAAT
 GAATCAAACCTTTCTTCTTGAGCATAATTACTTAATGATTTATTAATAATAGCCAGCATTTAAAAGC
 TTAATAATGTAAATATCATAAATGTGGTATCCTAGATAGCATCCAGAACAGAAAAAGGATATTAGGG

Figura 6 (continuación)

AAAAAGCTGGAGGAATGGAATAAATTATGCAGTTTAGTTATTAATAATGTACTAACGTCCTTAGTTA
 TGACGATTGTACCATGGTAATGTAAGATACTAACAAATAGAGGAAACCGGGTAAGGAGTATACAGT
 AACCTATATACTATCTTTGCAACTTTTTTTGTAAATTTAAAGCTTCTAAAATAAAGAACAATTTAAAC
 ATTAAGAAAGTATCACCAGGAACATATATCACTGTTTACAGATGAAATACATATGTATTTTCATATCTA
 ATTTCTGATCATTGACTTCAAATCAGAAAAGTGAATGACACCTCAAATCAGGTTTTCTGTTTACTG
 AAGTCTAAGAAAAGAAAAGCATACCAGCTGGAGAGATTTCATGTTTATAAAGACAGATTTATAACAA
 CAAAAATAAATATCCAAGAATAAATTTAAGAAGAAGCACTTTACTGAGAAAACATATGAAAACCT
 GAACAAATGGAGAGGGGATATTTTGTATTTGAATAGAAAAGACTTCTGGTTTTAAAGATAATTCTCTTT
 AAATTATTTTTTGTAGAAATTTAAGGGGTACAAGAGCAGTGTGTTCACATGGATATATTACATAGT
 GGTGAAGTCTGGGGTTTTAGTGTAAATTAATCTTTACATTTTGTGTGAGCCCAATAAATGTACCAAC
 ATGATTTTTATAGAAAAGATAGTCATTCCTATTAATCCAAACTTGTCCCAACTTTGAATTGAATTGAG
 GCAGAGCTAGCAGGTGTTCCCCACGGCTGAGGCATCTGAACATTAAGCATATCCCTCTGAGAACCA
 GCCTGCATTGATACTCTTTCTAATGTGGACAGCATCAAGCTATGTACCTAGTTCTGTGCTCAGCAAA
 AGCCCTGACTTCTTTTTGTTTTATGTCTAGCCCCATACAACAAAATCAACCAAGAAATTTTTGTTGT
 GGATCCAGTCACCTCTGAACATGAACCTGACATGTCAGGCTGAGGGCTACCCCAAGGCCGAAGTCTAT
 CTGGACAAGCAGTGACCATCAAGTCTGAGTGGTAAGACCACCACCACCAATTCCAAGAGAGAGG
 AGAAGCTTTTCAATGTGACCAGCACACTGAGAATCAACACAACAATAATGAGATTTTTCTACTGCA
 CTTTTAGGAGATTAGATCCTGAGGAAAACCATACAGCTGAATTGGTTCATCCAGGTAATATTCTGA
 ATGTGTCCATTAAAATATGTCTAACACTGTCCCTTAGCACCTAGCATGATGTCTGCCTATCATAGTC
 ATTCAGTGATTGTTGAATAAATGAATGAATGAATAAACACTATGTTTACAAAATATATCCTAATTCCT
 CACCTCCATTCTCCAAACCATATTGTTACTTAATAAACATTCAAGCAGATATTTATGGAATATACCT
 TTTGTTCATGCATTGTAGTACTCATTGGATACACATAGAATAATAAGACTCAGTTCACACTCTTCA
 GGAAACAGATAAAAAACTAAGAAACAAACAAAAAACAGGCAATCCAACACCATGTGGGAAATGC
 TTTCAATAGCCGGGAAACCTGGGGAAATACCTGAGAGGAATACTCAATTCAGGCCTTGTTCAGGAAT
 CCAAAATCCTGGCACATCAGAGCTGCTTCCCTCTTCCAGGGTGGCAGGAAATAAATGGAACATATT
 TTTCTATCTTATGCCAAACATGAGGGACCCCTTCTCCCCGGTGCCTCTCCCAAGGTAGTCTACAATA
 TTTCAACTCTAGCAGTCTGCTTAGTGCATAGAACATGAGGCTGTGTGTCCCTGGGCAAAATTAAG
 ACTTCTGTGTGCTTCACTTTCCCTGTAGGATTATAATCTACTGAGCAAGCTTATTGTAAGGGTCAGA
 TTAGCAACAGTGTATGAAAATGATTTGAGACCATTGCCTGCACAAATTCAACTATTTTTTTTTATCT
 CACTACTCTACAGAAGTAGGTAGGGTGGGAGACAGAGTCTGATGAGAGGCTCAGAATGTGAAAGA
 AAGTGAGGCGAGTGAGCATGATATTTAATATAAACACAAAGATATTCTGAGAAGAGCTGCTCACT
 GCCCCCTCCCCAATACATGTTGATAGGAAAATGCCACGTACTTCAGCAAAAACAACCTGAAAAATT
 AGATAGAAAAGTCAATCAATAGGAAAAGATAATCCAGGACGGTGTGTGTGAACAGAAAGAGGGGG
 AAAAACTTTAGAAAATGATGGGGATGCTCTTACTGGGGTACGAGTCTCAGGTATTGAACTGGCT
 TTCAGTAAAAGCTAGATTAGTGGGTTCCTGCCATTTACAAGCTGTTTTATGACAACCTTACTTGTGG
 GTGGCTACAGTAACTCACCTAACTGCACCTGAGTCTGTTTCTCATCTGTAAATTGGGGATTTTTTT
 TTAATAACCTGGCATGCCTAACTCATAAAGTTGTTCTGAAAACCTGAAATAAAACATACCTGAACAGG
 CATTGTAACCTGTAAGTTACGGAAAAAAGCTGGCTGTTGTTGTCTTTAAAGTTTCACTGGGTAGT
 CAAAGATGGATCATGGGTCTCAGTGGAGAGCTGAGCCAGGCAGGAGCTGACTAAGGGGTGAGAGGT
 GGGAGTTAGCAGCCTCTGAACATCTGTGTACCATGGGACCCCCCTTCTCTCTGCATGGTAACCCAG
 ACAAGGAGCCTAGTAAGAGATACTAATGGCTTGTGTGTCCAGAGATGTTCAAACCTGCAGAGAAAGA
 TAAGACAACAAGCATTTGGCTTCCAATCATGATGACAGATAGGAGGAGGTGGGAGTCTCTTAGCAG
 TGCTGGTTGGCTTCCATGTTCTACTGTGGGCCATCTCTGCCATGTACTGTAGGCTACTAGCTTCTAT
 ATTAAGAAATGCAAGAGGGGCCAGGAGCGGAGGCTCATGCTGTAAATCTCAGCACTTTGGGAGGC
 CAAGGTGGGCAGATCACTTGAGGTCAAGAGTTTGTGACCAGCCTGCCAACATGGTGAAACTCTGC
 CTTTACTAAAAATAAAAAATTAGCTGGGTGTGGTGGTGTGCACCTGTAATCCCAGCTACTCGGGA
 GACTGAGGCACAAGAATTGCTTGAACCTGGGAGGCGGAAAGTTGCAGTGAGCCCCAGATTGCCGCCAC
 TGCACCTCCACCTGGGCAACAGAGAAAGACTCTGCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAAGAGGA
 AGTGAATAAATCAAGGCCGCCATTAAATAGTGAAGCAGCCACTCCATGTGGTACTGTGCAAGCACAT
 TATAAATATTAGCCTCACAAGAAATGTATTAGCATTTGTATTTGTACACTGGTTAAGTATCTTGGC
 CAAGACCTCAAACTGGTTAAGGGCAGCAGAAFTTAGCCCCAGCACACCTTTTCAAAGCCTGGGC
 TTCTCACACTTCTCCATGCTGTTCOCATTTTAAACACAGGTATCTCGCCATTCCAGCCACTCAAACCTT
 GGCATTTAAGAAAATFATCCTAAAGCTAAACTAAACTTCAAGGATGACCATTCTCTGACCCCTTC

Figura 6 (continuación)

CCATCAAAATTTTATCTTTAGTCAGTTTGTGTTTCGTTTGTGTTTGTGTTTTCAGAACTACCTCTGGCAC
ATCCTCCAAATGAAAGG (SEQ ID NO:8)

Fragmento de humanización C

GTCAAGGTTCCCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTAGCAATATGACAATTGAATGCAAAATTC
CCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGCTGCCTAATTGTCTATTGGGAAATGGAGGATAAAGAACATT
ATTCAATTTGTGCATGGAGAGGAAGACCTGAAGGTTTCAGCATAGTAGCTACAGACAGAGGGCCCCG
GCTGTTGAAGGACCAGCTCTCCCTGGGAAATGCTGCCTTCAGATCACAGATGTGAAATTGCAGGA
TGCAGGGGTGTACCGCTGCATGATCAGCTATGGTGGTGGCGACTACAAGCGAATTACTGTGAAAGT
CAATGGTAAGAATTATTATAGATGAGAGGGCTGATCTTTATTGAAAACATAATCCAAAGTGTGAAAG
ACTTTTCATTCTTGTAAGTCCATACTTATTTTCAAACAGAACAGCATAGTCTGTTTCATTTCATTTC
AATTCATGAATTCATTCACATAATTATCCAAATTTCTTGAGCACTTATTTGATAGTCACTGGAAATCC
AGAGACAAACAACACAGAGCCATGTTCTACAGTATGTACAGTTTTCCAAAAAGAATTTCTAGTCTT
TACTTTTTTATTACAAATGGAATACGTATACTTGCAAATAATTCAGATACTGTGGAAGAGATCAAA
TGAATTGCAAAAGTGTCCCTCCCTCCCTTCACCACTATCTCCCATGGCATGCAGAGAGAGTAACCATT
ATTTGTGTGTCCCTCCAGAAATTTTTTTATTCAACTACTATTTTTTTTATTTTATTAGGTCCGTCAGTTT
TCCTTTTTTGAGCCTCTCTATATCAAATGCAAATAAATATATTTCAGAACAAACCCCACTGTAAAGGTT
CACATTAAAAAAGACTTGAAGTCAACCTATGAAGACAAAAAATAATCACATTAAAGTGTGAAAGAA
CCTATTCTTCAGTACAGGATAAGCCATACTTACTGGGCATATATTTCATCTTGAAAATCTATACTGA
TGTGTCTTGCGGAATTGAAAAGGAAGTGGAGTGTAGTTCTTCGGTATTGACCCACAGTTATGTT
ATCAGGTCACCTGAGTTCAAAGTTTTGTGTTGGCACTAGCTAAGTAAAGGAAAACACCTCTGCTTTC
ATTGTTGAGTTTACAGAAATTGAGAGCTGAAAGGATCCAGGCAGGAGCAGCTAATCCAAACTCCC
ACAAAGAACAAAATCCCCCAGAGGATCTCTGTTCTTATATTTCTGCAATGGCGTCCCTGTCTATA
TCCCACAATGGCCTCCCTGCCATTTGGATATCCCTTCCATATCTGTTGAAATTACTCCCTAATAGT
AAGCTGAAATCTGCCCCCTCTAGTTGTAGTCTTGGGATTATTTTCATTTACATGATGACCTTTTAATATT
TGACTAGAATTAAATCATCTCCCTTGGTCTTTCCATTCCTGGGCTAACTACCATCAATCTGAGGGC
TAACAATACAAGTAGAAAAAGTATACATTTGTCACTGATCACTGATCAATTTAATCAATGATCA
CTGATAACTATAAACTCAAAAACAAAATCATGTGGGGATTAAGAGAAATGTATCAGTTTTATGTTG
TATTTCTGGTCCCTGATACTGGCTCAGGTAATGCCACTATTGTCAAGAAGATACCCTTGTAAGTA
GATTTAATTTTCATTATATTTTACCATATGCTTCTCCATTTCATGACATCTCTTGAGATGTTGTGTTT
ATACTTTCAGTTTTTCTCCAGTCCATCCGCAATATCAGGCATCTACTGTGTTCCAAGATATTAAAG
AAATCATCATGACTTAGCCTCATCAACAGCATTGCTAGATCTGGGATGGAAAGGAAGAGTATAATC
CTGGCAGTCAGGAAGAAGGCAGCATAAAGTATAAGTTTCTGCTTCCAAAAAAGGTCTCTCATCAGC
CTGTAGGGAGTGTGTAGGGAAAGGGACAGCTGTCTTGTAGTAAAGGAAGGGTTTTATTTCAGGTCGTC
TGGGCTUCATAATATOCCTTGTGTATCTGCAGTCTCCTTTGCCATGGATCAACACAATAGGAAATCT
TCCGGCACTGATGGTTTTTCCAAAGGGGGAGTTCTTCTGGAGCAAAAGCAAAATGACCAACCAGGTTT
GAGGACCTGATTTGTTTGACAATTCATTTTGTATTTGTAATTAATTAATTTGCACTTCTACTCCCAAT
CCATCTTGTCAATTTGCATACAGTGGTTTTGGGATTTGAGTTTCAGCTATACCAAAAGTCTGAACCTTCT
GCACTTAGAACAAGGCAACCACCAAGCTTCACTTGCCTGAGGCGGTGTCTCCAATGGAAATGAGG
CAGCTGGCTTGCAAGGAGCTTCCCAACTCAGGGAAGTAGAACTCCTGAGTCACCTCCATATGCAAAAT
GATTTACAGTAATGCTGTTGAACCTTCACTTCCCATCACAGCAAAATGTGTGGTAACATAGCTTCCCC
ACAGGAGTTTACTCACCATGGTATTTTAAAGGTTGAAACATTTCAAAACTGAAATTTGAAAGAATTT
AGTTTTGGATTCACTCAATTATCACTATCACTTCCGGGTGTTATTGACACCTTTCTTGTGTTGAGTTTA
AATGCCAGACTCTCAGGCCACTAACTTTCAATTAAGGTTGTTTTTCTTTAATCGCTGAACCTAACAG
CAGGGAAAAACAAATGTTTCATTTCAGACTTTCAGAACTTCAATGAGATTAGGCAGCTGAAAGATCA
AAGTGTGTCATAGTTGTCCCGATAAAGCTATTTGGATCATATGGACCAAAATCGACTGCTGTCAATCC
CCACCAACCCCATCTCTCCCCAAAATTCACCAGCCCTGTTTAAAGTGTCTCTGTAGCATTTATCTCTAT
CTAGTATATTGTGTAGCATATCATATCATACTTTTCGTGTTTGTGTTTATTGTTCTCTCTCTCTCTAGAAAT
ATAAACTCCACAAGCACAAAGATTTGGGCTGTTTTATAATATTGTTGATCCCCAGGGCCCTGATAT
ACAGCAGAGTGGTGGTACGAAAAGAGCACACAAAAAAATATTGTTGAGTCAATGAATGAATGAT
TTCTCAAATAGGATTAGCCTAAAATTTTGGAAACATGAACAGATTTGGATATGTGAAAATTTATTT
CCAGACTGTTTCATCAGGAAGTGTAGCAGCTTCTAAAGGGTACACTGGAGCAGCAGTAGTAAAG
GAGGAAGAGGAGCAGCTCTGCTACTGCTACTATCGAGTACTACTACAAATAGCACTTGCTTATTCT

Figura 6 (continuación)

GTGTGTTAGGCCCTGFACTGAACACTCTGTCTAAATTAGTTCAFTTCCTCCTGGAAATGACTCTAGG
 GGGTAAGTGCTTCATCATGTAAGATGAGTATTTTTCACATTTTGTGTGTCTGAAATCTGAGTGTGT
 CTTTCAATGATGGAATCTTTGATTCCATGATAAGTGGTATTATTTCCATTTTAAGGATGAGGAAACT
 GAGGTCCAAAGAAATTAAGTAATTTGCCCAAATTCACCCAGCCTAGAAAATGATAAAGCTAGTTCT
 AAACCCCAAGCAGATTAGCTCTGAAGTCTGGGCCCTTAATAAACCACCTTTTATTTGCTATATTTGTAC
 CTCTGGTGTACGTATCAAGTTATATGTTGACTTCAAAACTATCATGACCCTTTCTTGGTTTGTATTGT
 CCAACATTAGTATAGTGTCTGGGTCTGCAAAAATTTTGATTACTCATCTCATCTGTAAAAACATTTT
 GAACTCGTGTGTTTGTGCATGCACATTTGTGTGTAATTATAAAAAATTTTACTTTCTGTTAATATATA
 AGTTGTATCATAAGAAACTGCCGTTTTTGAAGAGCAAAAAAAGGTTGAATGTTACCAGTTACATCT
 GGTTCACCTAATAGACATTTGTACAAAAACAGACATTTTAAAGAGGTTGAAATAAAAAATTTAATAA
 ACAATATTTTACGTTTTTACTAATTGTGATGCTTCACTATCATTAGCTAATATGTCAAGGCATAATA
 TACCTTAGGGTGAACCTTTATCATTAAACAAAGGTGGATGGTGTCAATAATCTTGAGGTTTGTGTTTTT
 TTATATAACACTGCCAGGTCTAATTAAGTACTTACTGTTTACCACCTCATACAGTGGCCGATAAAA
 AGTGTCACTTCTGCTGTTTCTCTGGGTGTGCTTGAATTATTAGTATTATCTTCAGTCCCTCAGTTTC
 TTTGTGGGAAACTTTTTAATTAGTTGTTTAAATTTTGTAAAGATGGTTAGTTTACTCAAAATTAGATAA
 GAGAATTTGAAAAATCCGTAGCTACCCCAAAGCAACCTACACATAAGAACTATTATTTTGTGTTTTG
 AAATCATAATTTTATTGATTTCCAGTGTTCCTCACTGGTAGTGGTTTCATTGATATAGGAGTATCAAA
 ACATCACTCATTTATTTATTTTCAGTTTCATTTGATCCTAGCCGTTTTGTATTAACCTCTCTGTGAAGAAA
 TTACCTCACAAATCTATTGCTGTC (SEQ ID NO:9)

Fragmento de humanización D

CTTGGTAAAGGAATGGAGAATTAAGGCTCTAGATCATTAGTGGTTACACTATAGTATTAGAAGTAA
 AAAAAAGATTATACCAACAAAATAAGAACATGTTAATGTACTTGTAAATGAATAAACATGAATAAA
 GCTCTTATGCTATATAGGTGCACTAAACAATCTACTAGAATTGTCAAGCAAACTACGTATCTTAATCC
 TGAAAGGGTCCCAAACCAATGATCTAAAATTGAATCAAACCTTCTTCCTTGAGCATAATTACTTAA
 ATGATTTATTAATAATAGCCAGCATTTAAAAGCTTAAAATGTAAATATCATAATGTGGTATCCTAGA
 TAGCATCCAGAACAGAAAAAAGGATATTAGGGAAAAAAGCTGGAGGAATGGAATAAATTTATGTCAGTT
 TAGTTATTAATAATGTACTAACGTCCTTAGTTATGACGATTGTACCATGGTAATGTAAGATACTAAC
 AATAGAGGAAACCGGGTAAGGAGTATACAGTAACTCTATACTATCTTTGCAACTTTTTGTAAATTT
 AAAACTTCTAAAATAAAGAACAAATTTAAACATTAAGAAAGTATCACCAGGAACATATATCACTGTT
 TACAGATGAAATACTATGTATTTTCATATCTAATTTCTGATCATTGACTTCAAAATCAGAAAAAGTGAA
 TGACACCTCAAAATCAGGTTTTCTGTTTACTGAAGTCTAAGAAAAAGAAAGCATAACCACTGGAGAG
 ATTCATGTTTATAAAGACAGATTTATAACAACAAAAATAAATATCCAAGAATAAATTTAAGAAGA
 AGCACTTTACTGAGAAACATATGAAAACCTGAACAAATGGAGAGGGATATTTTGTATTGTGAATAGA
 AAGACTTCTGGTTTAAAGATAATTCTCTTTAAATTTATTTTTGTAGAAATTTAAGGGGTACAAGAGC
 AGTGTGTGCACATGGATATATTACATAGTGGTGAAGTCTGGGGTTTTAGTGTAATTAATCTTTACA
 TTTTTGTTTGAGCCCAATAAATGTACCAACATGATTTTTATAGAAAGATAGTCATTCCTATTAATCCA
 AACTTGTCCCAACTTTGAATTTGAATTTGAGGCAGAGCTAGCAGGTGTTCCCCACGGCTGAGGCATCT
 GAACATTAAGCATATCCCTCTGAGAAACAGCCTGCATTGATACTCTTTCTAATGTGGACAGCATCA
 AGCTATGTACGTAGTTCTGTGCTCAGCAAAAGCCCTGACTTCTTTTTGTTTATGTCTAGCCCATTA
 CAACAAAATCAACCAAGAAATTTTGGTTGTGGATCCAGTCACCTCTGAACATGAACCTGACATGTCA
 GGCTGAGGGCTACCCCAAGGCCGAAGTCACTGGACAAGCAGTGACCATCAAGTCCCTGAGTGGTA
 AGACCACCACCACCAATTCCAAGAGAGAGAGGABAAGCTTTTCAATGTGACCAGCACACTGAGAAATC
 AACACAACAACTAATGAGATTTTCTACTGCACCTTTTAGGAGATTAGATCCTGAGGAAAAACCATACA
 GCTGAATTTGGTATCCCAAGGTAATATTCTGAATGTGTCCATTAAAAATATGCTAACACTGTCCCTTA
 GCACCTAGCATGATGTCTGCCATCATAGTCATTCACTGATTGTTGAATAAATGAATGAATGAATA
 ACCTATGTTTACAAAATATATCCTAATTCCTCACCTOCATTATCCAAACCATATTGTTACTTAAT
 AAACATTCAAGCAGATATTTATGGAATATACCTTTTGTTCATGCTATTGTAGTACTCATTGGATACAC
 ATAGAATAATAAGACTCAGTTCACACTCTTCAGGAAACAGATAAAAACTAAGAAACAAACAAAA
 AACAGGCAATCCAAACACCATGTGGGAAATGCTTTCATAGCCCGGAAACCTGGGGAAATACCTGAGA
 GGAATACTCAATTCAGGCCTTGTTCAGGAATCCAAATCCTGGCACATCAGAGCTGCTTCCCTCTTT
 CCAGGGTGGCAGGAAATAAATGGAACATAATTTTCTATCTTATGCCAAACATGAGGGACCCCTTCT
 CCCCCGTGCTCTCCCAAGGTAGTCTACAATATTTCAACTCTAGCAGTCTGCTTAGTGCATAGAACA

Figura 6 (continuación)

TGAGGCTGTGTGTCCTGGGCAAATTACTAGACTTCTGTGTGCTTCACTTTCCTGTAGGATTATAA
 TCTACTGAGCAAGCTTATTGTAAGGGTCAGATTAGCAACAGTGTATGAAAATGATTTGAGACCATT
 GCCTGCACAAATTCAACTATTTTTTTTTTATCTCACTACTCTACAGAAGTAGGTAGGGTGGGAGACAG
 AGTCTGATGAGAGGCTCAGAATGTGAAAAGAAAGTGAGGCGAGTGAGCATGATATTTAATATAAAC
 ACAAGATATTCTGAGAAGAGCTGCTCACTGCCCTCCCTCAATACATGTTGATAGGAAAATGCC
 ACGTACTTCAGCAAAAACAACAGAAAATTAGATAGAAAAGTCAATCAATAGGAAAAGATAATCC
 AGGACGGTGTGTGAACAGAAAGAGGGGGGAAAAAACTTTAGAAAATGATGGGGATGCTCTTACTG
 GGGTACGAGTCTCAGGTATTGAACCTGGCTTTCAGTAAAAGCTAGATTAGTGGGTTCCTGCCATTT
 ACAAGCTGTTTTATGACAACCTTACTTGTGGGTGGCTACAGTAACTCACCTAACTGCACTGAGTCT
 GTTTCCTCATCTGTAAATTGGGGATTTTTTTTTTAAATACCTGGCATGCCTAACTCATAAAGTTGTTCT
 GAAACTGAAATAAAACATACGTGAACAGGCATTGTAAACTGTAAGTTACGGAAAAAGCTGGCTGT
 TGTGTGTCTTTAAAGTTTCACTGGGTAGTCAAAGATGGATCATGGGTCTCAGTGGAGAGCTGAG
 CCAGGCAGGAGCTGACTAAGGGGTGAGAGGTGGGAGTTAGCAGCCTCTGAACATCTGTGTACCATG
 GGACCCCTTTCTCTCTGCATGGTACCCAGACAAGGAGCCTAGTAAGAGATACTAATGGCTTGT
 GTCCAGAGATGTTCAAACCTGCAGAGAAAGATAAGACAACAAGCATTGGCCTCCAATCATGATGAC
 AGATAGGAGGAGGTGGGAGCTCTTAGCAGTCTGTGGTGGCTTCCATGTTCTACTGTGGGCCATC
 TCTGCCATGTACTGTAGGCTACTAGCTTCTATATTAAAGAAATGCAAGAGGGGGCCAGGAGCGGAGGC
 TCATGCCTGTAATCTCAGCACTTTGGGAGGGCCAAAGGTGGGCAGATCACTTGAGGTGAGGATTTGT
 GACCAGCCTGGCCAAACATGGTGAAACTCTGCCCTTACTAAAAATATAAAAATTAGCTGGGTGTGGT
 GGTGTGCACCTGTAATCCCAGCTACTCGGGAGACTGAGGCACAAGAATTGCTTGAACCTGGGAGGC
 GGAAGTTGCAGTGAGCCAGATTGCGCCACTGCACTCCACCTGGGCAACAGAGAAAAGACTCTGC
 CTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAAGAGGAAGTGAATAATCAAGGCCGCCATTAAATAGTGAGC
 AGCCACTCCATGTGGTACTGTGCAAGCACATTATAAATATTAGCCTCACAAGAAATGTATTAGCAT
 TTGTATTTTGTACACTGGTTAAGTATCTTGCCCAAGACCTCAAACTGGTTAAGGOCAGCAGAATTT
 AGCCCCAGCACCACCTTTCAAAGCCTGGGCTTCTCACACTTCTCCATGCTGTTCCTATTTAACAC
 AGGTATCTCGCCTATCCAGCCACTCAAACCTTTGGCATTTAAGAAAATTATCCTAAAAGCTAAACTAA
 ACTTCAAAGATGACCATTCTCCTGACCCCTTCCCATCAAAATTTTATCTTTAGTCAGTTTGTTTTCGT
 TTTGTTTTGTTTTTTCAGAACTACCTCTGGCACATCCTCCAAATGAAAGG (SEQ ID NO: 10)

Fragmento de humanización E

GTCACGGTTCCTCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTAGCAATATGACAATGGAATGCAAATTC
 CCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGCTGCCTAATTGTCTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACATT
 ATTCAATTTGTGCATGGAGAGGAAGACCTGAAGGTTGAGCATAGTAGCTACAGACAGAGGGCCCCG
 GCTGTTGAAGGACCAGCTCTCCTGGGAAATGCTGCCTTCAATCAGATCAGAGATGTGAAATTCAGGA
 TGCAGGGGTGTACCCCTGCATGATCAGCTATGGTGGTGCCGACTACAAGCGAATTACTGTGAAAGT
 CAATGGTAAGAATTAATATAGATGAGAGGCTTGATCTTTATTGAAAACATAATCCAAAGTGTGAAAG
 ACTTTTCATTCTTGTAAAGTCCATCTTATTTTCAAACAGAACAGCATAGTCTGTTCATTCATTCTTC
 AATTCATGAATTCATTCACATAATTATCCAAATTCCTGAGCACCTATTTGATAGTCACTGGAAATCC
 AGAGACAAAACAACACAGAGCCATGTTCTACAGTATGTACAGTTTTCUAAAAAGAAATTTCTAGTCTT
 TACTTTTTTATTACAAATGGAATACGTATACTTGCAAATAATTCAGATACTGTGGAAGAGATCAAA
 TGAATTGCAAAGTGTCCCTCCCTCCCTTCACTATCTCCCATGGCATGCAGAGAGAGTAACCATT
 ATTTGTGTGTCCTCCAGAAAATTTTTTATTCAACTACTATTTTTTTATTTTATTAGGTCCGTCAGTTT
 TECTTTTTTGAGCCTCTCTATATCAAAATGCAAATAAATATATTACAGAACAAACCCCACTGTAAAGGT
 CACATTAATAAAGACTTGAAGTCAACCTATGAAGACAAAAAATAATCACATTAAAGTGTGAAAGAA
 CCTATTCTTCCAGTACAGGATAAGCCATACTTACTGGGCATATATTATCTTTGAAAATCTATACTGA
 TGTGTCTTGGGGAATTGAAAAGGAAGTAGGAGTGTAGTTCTCTGGTATTGACCCACAGTTATGTT
 ATCAGGTCACCTTGAGTTCAAAGTTTTGTGTGGCACTAGCTAAGTAAAGGAAAAACACCTCTGCTTTC
 ATTGTTGAGTTTACAGAAATGAGAGCTGAAAGGATCCCAGGCAGGAGCAGCTAATCCAACTCCC
 ACAAGAACAATAATCCCCAGAGGATCTTCTGTTCTTATATTTCTGCAATGGCGTCCCTGTCTATA
 TCCCACAATGGCCTCCCTGCCATTTGGATATCCCTTCCATATCCTGTTGAAATTACTCCCTAATAGT
 AAGCTGAAATCTGCCCTCTAGTTGTAGTCTTGGGATTATTTCAATTTACATGATGACCTTTTAATATT
 TGACTAGAATTAATCATCTCCCTTGGTCTTCCATTCCTGGGCTAACTACCATCAATCTGAGGGC
 TAACAATACAAGTAGAAAAAGTATACATTTGTCACTGATCACTGATCAATTATTAATCAATGATCA

Figura 6 (continuación)

CTGATAACTATAAACTCAAAAACAAAATCATGTGGGGATTAAAGAGAAATGTATCAGTTTTATGTTG
 TATTTCTGGTCCCTGATACTGGCTCAGGTAATGCCACTATTGTCAAGAAGATACCACTTGTAAGTA
 GATTTAATTTTCATTATATTTTACCATATGCTTCTCCATTTCATGACATCTCTTGAGATGTTGTGGTTT
 ATACTTTCAGTTTTTCTCCAGTCCATCCGCAAAATATCAGGCATCTACTGTGTTCGAAGATATTAAG
 AAATCATCATGACTTAGCCTCATEAACAGCATTGCTAGATCTGGGATGGAAAAGGAAGAGTATAATC
 CTGGCAGTCAGGAAGAAGGCAGCATAAAAGTATAAAGTTTCTGCTTCCAAAAAAGGTCTCTCATCAGC
 CTGTAGGGAGTGTGTAGGGAAGGGACAGCTGTCTTGTAGTAGGGAAGGGTTTTATTACGGTCGTC
 TGGGCTCCATAATATCCCTTGTGTATCTGCAGTCTCCTTTGCCATGGATCAACACAATAGGAAATCT
 TCCGGCACTGATGGTTTTTCCAAGGGGGAGTTCTTCTGGAGCAAAGCAAATGACCAACCAAGTTT
 GAGGACCTGATTTGTTGACAATTCATTTTGTATTGTAAATTAATTGATTCATCTACTCCCAAT
 CCATCTTGTCAATTTGCATACAGTGGTTTTGGGATTTGAGTTCACTATACCAAAAGTCTGAACCTTCT
 GCACTTAGAACAAGGCAACCAAGCTTCACCTTGCACTGAGGCGGTGTCTCCAATGGAAATGAGG
 CAGCTGGCTTGCAGGAGCTTCCCAACTCAGGGAAGTAGAACTCCTGAGTCACTTCCATATGCAAAAT
 GATTTACAGTAATGCTGTGAACTTCACCTTCCCATCACAGCAAATGTGTGGTAACATAGCTTCCCC
 ACAGGAGTTTACTCAACATGGTATTTTAAAGGTGAAACATTTCAAAACTGAAATTTGAAAGAAATTT
 AGTTTTGATTCACCTCAATFATCACTATCACTTCGGGTGTTATTGCACCTTCTTGTTTGTGAGTTTA
 AATGCCAGACTCTCAGGCCACTAACCTTCAATTAAGAGTGTTTTTCTTTAATCCCTGAACCTAACAG
 CAGGGAAAACGAAATGTTTCATTCAGACTTTCAGAACCTTCAATGAGATTAGGCAGCTGAAAAGATCA
 AAGTGTGTGCATAGTTGTCCCGATAAAGCTATTTGGATCATATGGACCAAATCGACTGCTGTCTATTC
 CCACCAACCCCATCTCTCCCCAAAATTCACAGCCCTGTTTAAAGTGTCTCTGTAGCATTTATCTCTAT
 CTAGTATATTGTGTAGCATATCATATCACTTTTCTGTTTTGTTTATTGTCTCTCTCCTCTAGAAT
 ATAAACTCCACAAGCACAAAGATTTGGGCTGTTTTATAATATTGTTGCATCCCCAGGGCCTGATAT
 ACAGCAGAGTGGTGGTACGAAAAGAGCACACAAAAAAATATTTGTTGAGTCAATGAATGAATGAT
 TTCTCTCAAAATAGGATTAGCCTAAAATTTTGGAAACATGAACAGATTTGGGATATGTGAAAATTTATTT
 CCAGACTGTTTCATCAGGAACTGTTAGCAGCTTCTAAAGGGTACACTGGAGCAGCAGTAGTAAAAG
 GAGGAAGAGGAGCAGCTCTGCTACTGCTACTATCGAGTACTACTACAATTAGCACTTGCTTATTCT
 GTGTGTTAGGCCCTGTACTGAACACTCTGTCTAAATTAGTTCAATTCCTCCTGGAAATGACTCTAGG
 GGGTAAGTGCTTCATCATGTAAGATGAGTATTTTTCACATTTTGTGTGTCTGAAATCTGAGTGTGT
 CTTTCAATGATGGAATCTTGTATCCATGATAAGTGGTATTATCCCATTTTAAAGGATGAGGAACT
 GAGTCCCAAAGAAATTAAGTAATTTGGCCAAATTCACCCAGCCTAGAAAAATGATAAAGCTAGTTCT
 AAAACCAAGCAGATTAGCTCTGAAGTCTGGGCCCTTAATAACCACTTTTTATTGCCTATATTTGTAC
 CTCTGGTGTACGTATCAAGTTATATGTTGACTTCAAAACTATCATGACCTTTTTCTTGGTTTTGATTGT
 CCAACATTAGTATAGTGTCTGGGTCTGCAAAAATTTTGATTACTCATCTCATCTGTAAAACATTTT
 GAACCTGCTGTGTTTTGTGCATGCACATTTGTGTGTAATTATAAAAAATTTTACTTCTGTTAATATATA
 AGTTGTATCATAAGAACTGCCGTTTTTGAAGAGCAAAAAAAGGTTGAATGTTACCAGTTACATCT
 GGTTCACCTTAATAGACATTTGTACAAAAACAGACATTTTAAGAGGTTGAAAATAAAAAATTTAATAA
 ACAATATTTTCAGTTTTTACTAATTTGTGATGCTTCACTATCATTAGCTAATATGTCAAGGCATAATA
 TACCTTAGGGTGAACTTTATCATTAACAAAGGTGGATGGTGTCAATAATCTTGAGGTTTGTGTTTTT
 TTATATAACACTGCGAGGTCTAATTAAGTACTTACTGTTTACCACCTCATACAGTGGCCGATAAAA
 AGTGTCACTTCTGCTGTTTCTCTGGGTGTGCTTGAATTATTAGTATTATCTTCAGTCTCAGTTTC
 TTTGTGGGAAACTTTTTAATFAGTTGTTTTAATTTGTAAGATGGTTAGTTTACAAAATTAGATAA
 GAGAATTTGAAAAATCCGTAGCTACCCCAAAGCAACCTACACATAAGAAGCTATTATTTTGTGTTTTG
 AAATCATAATTTTATTGATTTCAGTGTTTTCCACTGGTAGTGTGTTTCAATTGATATAGGAGTATCAAA
 ACATCACTCATTAATTTATTTTCAGTTTCATTTGATCCTAGCCGTTTTGTATTAACTCTCTGTGAAGAAA
 TTACCTCACAAATCTATTGCTGTCTTGTAAAGGAATGGAGAATTAAGGCTCTAGATCATTAAGTG
 GTTACACTATAGTATTAGAAGTAAAAAAAAGATTATACCAACAAAATAAGAACATGTTAATGTACT
 TGTAATGAATAAACATGAATAAAGCTCTTATGCTATATAGGTGCACTAAACAATCTACTAGAATTG
 TCAGCAAACTACGTATCTTAATCCTGAAAGGGTCCCAAACCAATGATCTAAAAATGAATCAAACTT
 TCTTCTTGAGCATAATTACTTAAATGATTTATTAATAAGCCAGCATTTAAAAAGCTTAAAAATGTAA
 ATATCATAATGTGGTATCCTAGATAGCATCCCAGAACAGAAAAAGGATATTAGGGAAAAAAGCTGGA
 GGAATGGAATAAATATGCAGTTAGTTATTAATAATGTACTAACCTCCTTAGTTATGACGATTGTA
 CCATGGTAATGTAAGATACTAACAATAGAGGAAACCGGGTAAGGAGTATACAGTAACCTCTATACT
 ATCTTTGCAACTTTTTTGTAAATTTAAAACCTTCAAAAATAAAGAACAAATTTAAACATTAAAAAGTA

Figura 6 (continuación)

TCACCAGGAACATATATCACTGTTTACAGATGAAATACTATGTATTTTCATATCTAATTTCTGATCA
 TTGACTTCAAATCAGAAAAGTGAATGACACCTCAAAATCAGGTTTTCTGTTTACTGAAAGTCTAAGA
 AAAGAAAAGCATACCAGCTGGAGAGATTTCATGTTTATAAAGACAGATTTATAACAACAAAAATAAA
 ATATCCAAGAATAAATTTAAGAAGAAGCACTTTACTGAGAAAACATATGAAAACCTGAACAAATGG
 AGAGGGATATTTTGTATTTGAATAGAAAGACTTCTGGTTTAAAGATAAATCTCTTTAAATTATTTTT
 TGTAGAAAATTTAAGGGGTACAAGAGCAGTGTGTGCACATGGATATATTACATAGTGGTGAAGTCTG
 GGGTTTTAGTGTAAATTAATCTTTACATTTTGTGTTGAGCCCAATAAATGTACCAACATGATTTTTAT
 AGAAAAGATAGTCATTCCTATTAATCCAAACTTGTGCCAACCTTGAATTGAATTGAGGCAGAGCTAG
 CAGGTGTTCCCCACGGCTGAGGCATCTGAACATTAAGCATATCCCTCTGAGAACCAGCCTGCATTG
 ATACTCTTTCTAATGTGGACAGCATCAAGCTATGTACGTAGTTCGTGTGCTCAGCAAAAAGCCCTGACT
 TCTTTTTGTTTTATGTCTAGCCCCATACAACAAATCAACCAAGAATTTTGGTTGTGGATCCAGTC
 ACCTCTGAACATGAACTGACATGTGAGGCTGAGGGCTACCCCAAGGCCGAAGTTCATCTGGACAAG
 CAGTGACCATCAAGTCTGAGTGGTAAGACCACCACCACCAATTCCAAGAGAGAGGAGAAGCTTT
 TCAATGTGACCAGCACACTGAGAATCAACACAACAACATAATGAGATTTTCTACTGCATTTTAGGA
 GATTAGATCCTGAGGAAAACCATACAGCTGAATTGGTCATCCAGGTAATATTCTGAATGTGTCCA
 TFAAAATATGTCTAACACTGTCCCTAGCACCTAGCATGATGTCTGCCTATCATAGTCAATTCAGTGA
 TTGTTGAATAAATGAATGAATGAATAACACTATGTTTACAAAATATATCCTAATTCCTCAOCTCCAT
 TCATCCAAACCATATTGTTACTTAATAAACATTCAGCAGATATTTATGGAATATACCTTTTTGTTCCA
 TGCATTGTAGTACTCATTGGATACACATAGAATAATAAGACTCAGTTTCACACTCTTCAGGAAACAG
 ATAAAAAACTAAGAAAACAAACAAAAAACAGGCAATCCAACACCATGTGGGAAATGCTTTCATAGC
 CCGGAAAACCTGGGGAATACCTGAGAGGAATACTCAATTCAGGCCCTTGTTCAGGAATCCAAATCCT
 GGCACATCAGAGCTGCTTCCTCTTCCAGGGTGGCAGGAAATAAATGGAAACATATTTTCTATCTT
 ATGCCAAACATGAGGGACCTTCTCCCGGTGCTCTCCCAAGGTAGTCTACAATATTTCAACTCT
 AGCGCTGTGCTTAGTGCATAGAACATGAGGCTGTGTGTGCCCTGGGCAAAATTACATAGACTCTGTGT
 GCTTCACTTTCCCTGTAGGATTATAATCTACTGAGCAAGCTTATTGTAAGGGTCAGATTAGCAACAG
 TGTATGAAAATGATTTGAGACCATTGCCGTCACAAATTCAACTATTTTTTTTTATCTCACTACTCTAC
 AGAAGTAGGTACGGTGGGAGACAGAGTCTGATGAGAGGCTCAGAATGTGAAAAGAAAGTGAGGCG
 AGTGAGCATGATATTTAATATAAACACAAAGATATTCTGAGAAGAGCTGCTCACTGCCCTCCCT
 CAATACATGTTGATAGGAAAATGCCACGTACTTCAGCAAAAACAACCTGAAAAATTAGATAGAAAA
 GTCAATCAATAGGAAAAGATAATCCAGGACGGTGTGTGTGAACAGAAAGAGGGGGGAAAAAACTTTA
 GAAAATGATGGGGATGCTCTTACTGGGTACGAGTCTCAGGTATTGAACTGGCTTTCAGTAAAAG
 CTAGATTAGTGGGTTCTGCCATTTACAAGCTGTTTTATGACAACCTTACTTGTGGGTGGGCTACAG
 TAACTCACTAACTGCACCTGAGTCTGTTTCCCTCATCTGTAAATTGGGGATTTTTTTTTTAAATACCTGG
 CATGCCCTAACTCATAAAGTTGTTCTGAAACTGAAATAAAACATACGTGAACAGGCATTGTAAACTG
 TAAGTTACGGAAAAAGCTGGCTGTTGTTGTGTCTTTAAAGTTTCACCTGGGTAGTCAAAGATGGAT
 CATGGGTCTCAGTGGAGAGCTGAGCCAGGCAGGAGCTGACTAAGGGTGAGAGGTGGGAGTTAGCA
 CCTCTGAACATCTGTGTACCATGGGACCCCTTTCCCTCCTGCATGTTACCCAGACAAGGAGCCT
 AGTAAGAGATACTAATGGCTTGTGTGTCAGAGATGTTCAAACCTGCAGAGAAAGATAAGACAACAA
 GCATTGGCTCCCAATCATGATGACAGATAGGAGGAGGTGGGAGCTCCTTAAGCAGTCTGTTGGCC
 TTCCATGTTCTACTGTGGGCCATCTCTGCCATGTACTGTAGGCTACTAGCTTCTATATTAAAGAATG
 CAAGAGGGGECAGGAGCGGAGGCTCATGCCGTGTAATCTCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGTGGGCA
 GATCACTTGAGGTCAAGGAGTTTGTGACCAAGCTGGGCCAACATGGTGAAACTCTGCCCTTACTAAAA
 ATATAAAAAATTAGCTGGGTGTGTTGGTGTGCACCTGTAATCCAGCTACTCGGGAGACTGAGGCAC
 AAGAATTGCTTGAACCTGGGAGGCGGAAGTTGCAGTGAGCCCAGATTGCCGCACTGCCTCCACCC
 TGGGCAACAGAGAAAGACTCTGCCCTCAAAAAAAGCAAGAGGAAGTGAAATAATC
 AAGGCCGCCATTTAATAGTGAGCAGCCACTCCATGTGGTACTGTGCAAGCACATTAATAATATTAG
 CCTCACAAGAAATGTATTAGCATTGTATTTTGTACACTGGTTAAGTATCTTGCCCAAGACCTCAAA
 ACTGGTTAAGGGCAGCAGAATTTAGCCCCAGCACCTTTTCAAAGCCTGGGCTTCTCACACTTCT
 CCATGCTGTTCCCATTTTAAACACAGGTATCTCGCCATTCAGGCCACTCAAACCTTGGCATTTAAGAA
 AATTATCCTAAAGCTAAACTAAACTCAAGGATGACCAATCTCCTGACCCCTTCCCATCAAAATTTT
 ATCTTTAGTCAGTTTGTGTTTCGTTTGTGTTTTCAGAACTACCTCTGGCACATCCTCCAAATGA
 AAGG (SEQ ID NO:11)