

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 800**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2011 PCT/US2011/032494**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011 WO11130512**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2011 E 11769588 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2558576**

54 Título: **Ratón lampiño NOD/SCID**

30 Prioridad:

14.04.2010 US 324030 P
08.10.2010 US 391444 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.02.2017

73 Titular/es:

ENVIGO RMS, INC. (100.0%)
8520 Allison Pointe Blvd., Suite 400
Indianapolis, IN 46250, US

72 Inventor/es:

WILDT, SHERYL

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 601 800 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

Ratón lampiño NOD/SCID

Esta solicitud reivindica prioridad de acuerdo con el título 35 del código de los Estados Unidos (U.S.C.) § 119(e) de la solicitud provisional estadounidense serie No. 61/324,030, presentada el 14 de abril de 2010 y la solicitud provisional estadounidense serie No. 61/391,444, presentada el 8 de octubre de 2010.

Campo técnico

La presente divulgación concierne en términos generales a la investigación biomédica. Más específicamente, la presente divulgación concierne a un ratón con ventajas genéticas para la investigación biomédica.

Antecedentes y resumen

Existen cientos de mutantes patológicos en ratones y ratas, muchos de estos son de interés para la investigación biomédica. Los ratones mutantes se usan normalmente para investigación especializada y proyectos de desarrollo. Los ratones mutantes pueden mantenerse con antecedentes genéticos exogámicos y endogámicos cuyas propiedades confieren ventajas y desventajas genéticas. Por ejemplo, el gen desnudo atímico en el antecedente HsdCpb:NMRI exogámico produce un animal relativamente robusto pero la misma mutación en ratones que tienen un antecedente BALB/cOlaHsd produce un animal menos robusto.

Prkdc^{scid} es una mutación del gen que codifica la subunidad catalítica de proteína quinasa activada por ADN (Prkdc) que da lugar a una inmunodeficiencia combinada severa (scid) (para reseña véase Bosma y Carroll, 1991). Es una mutación recesiva autosómica que afecta la diferenciación de las células progenitoras de célula B y célula T debido a un sistema defectuoso de variable, diversidad y unión (VDJ) de recombinación, que es necesario para generar receptores de célula B y T. Los ratones con una mutación Prkdc carecen de células epidérmicas dendríticas Thy-1-positivas. A diferencia de los ratones desnudos, los ratones mutantes Prkdc^{scid} poseen un timo y nudos linfáticos.

El ratón diabético no obeso (NOD) es un modelo animal de diabetes tipo 1 que exhibe una susceptibilidad al desarrollo espontáneo de diabetes mellitus dependiente de insulina mediada por células T (IDDM). La cepa NOD y las cepas relacionadas fueron desarrolladas en Shionogi Research Laboratories en Aburahi, Japón, por Makino y colegas y se reportó por primera vez en 1980 (Makino et al., 1980). Adicionalmente, las cepas NOD normalmente se caracterizan por un déficit funcional de células aniquilantes naturales (NK), defectos en el desarrollo y la función mieloide como también en la diferenciación y la función de células que presentan antígeno (APCs), y una deficiencia C5 que inhibe la activación de las vías, tanto clásicas como alternativas, del complemento hemolítico (Greiner et al., 1998).

Las cepas de ratón que portan una mutación Prkdc^{scid} mientras muestran una falta de la función de célula B y T, expresan niveles normales de células NK, función de complemento hemolítico y mieloide. Adicionalmente, los mutantes Prkdc^{scid} en diversas cepas antecedentes producen inmunoglobulina y células T funcionales a bajos niveles a medida que los ratones envejecen, un fenómeno denominado "filtración". Estas propiedades inmunes innatas son desventajas para ciertas aplicaciones de investigación, especialmente prendimiento de líneas celulares tumorales humanas.

La mutación Prkdc^{scid} ha sido transferida desde el antecedente C.B-17 al antecedente diabético no obeso (NOD) susceptible de diabetes y se denomina NOD scid. A diferencia del ratón NOD típico, el desarrollo de diabetes autoinmune no ocurre debido a la falta de función de célula T. Los ratones NOD scid se caracterizan además por un déficit funcional de células NK, deficiencia de macrófagos y una falta de complemento hemolítico detectable (Greiner et al., 1998).

Adicionalmente, el fenotipo "con fugas" de los ratones scid homocigóticos que resultan del bloqueo incompleto de la actividad de recombinasa VDJ que conduce a actividad residual de célula B y T, se suprime en este modelo en comparación con otros ratones scid en diversos antecedentes genéticos. Estas características son ventajosas para estudios que involucran crecimiento a largo plazo de células trasplantadas. Por ejemplo, líneas celulares humanas tales como PC-3 y DU145, y células madre positivas CD-34 pueden cultivarse efectivamente a largo plazo en ratones NOD/scid, pero no en otros ratones scid que exhiben una función normal de células NK, macrófagos y complemento circulante que puede influir en el crecimiento tumoral o en el prendimiento de células madre humanas. El perfil inmunológico del ratón NOD scid lo vuelve útil para investigación biomédica en oncología, inmunología, hematología, patología de VIH y otros campos.

A pesar de su idoneidad para numerosas aplicaciones, los ratones NOD scid exhiben algunas características que pueden ser desventajas para ciertos propósitos de investigación. Por ejemplo, los ratones NOD scid tienen un recubrimiento total de pelo albino de modo que su pelo tiene que afeitarse antes de la inoculación de células, y la subsiguiente visualización y captación de imágenes de tumores es más difícil que en un modelo lampiño. Además, incluso después de afeitar un ratón

peludo, los folículos pilosos permanecen los cuales pueden presentar autofluorescencia e interferencia con estudios de imágenes que emplean reporteros bioluminiscentes y fluorescentes. El mutante homocigótico lampiño, a diferencia de los ratones desnudos, está desprovisto de folículos pilosos (Lyon et al., 1996) eliminando de esta manera la autofluorescencia de los folículos que ocurre en otros modelos de xenoinjerto.

- 5 En la presente se describen mejoras al ratón NOD scid hechas cruzando ratones NOD scid con un ratón que porta una mutación en el gen lampiño y retrocruzando en el antecedente genético NOD scid para producir una cepa de ratón lampiño NOD scid. Los ratones lampiños NOD scid divulgados en la presente son particularmente ventajosos para los estudios de trasplante de xenoinjerto, tumores espontáneos, tumorigénesis celular cancerosa, angiogénesis tumoral, potencial metastásico tumoral, terapia de supresión tumoral, regulación de carcinogénesis, captación de imágenes de tumores y
- 10 prendimiento de células madres humanas. Por consiguiente, en un aspecto la presente invención proporciona un método para incrementar la inmunodeficiencia de un modelo de ratón inmunodeficiente que tiene una mutación homocigótica Prkdc^{scid} sobre un antecedente diabético no obeso (NOD.CB17-Prkdc^{scid}) y que tiene pelo, transfiriendo una mutación homocigótica Hr^{hr} al ratón, en cuyo caso el modelo de ratón inmunodeficiente que tiene inmunodeficiencia incrementada es lampiño y tiene una reducción en el número de células dendríticas en comparación con el modelo de ratón NOD.CB17-
- 15 Prkdc^{scid}. La invención también proporciona el uso de la mutación Hr^{hr} para incrementar la inmunodeficiencia de un modelo de ratón inmunodeficiente que tiene una mutación homocigótica Prkdc^{scid} sobre un antecedente diabético no obeso (NOD.CB17-Prkdc^{scid}) y que tiene pelo, reduciendo la cantidad de células dendríticas en el ratón. En el método o en el uso de acuerdo con la invención, el ratón inmunodeficiente o el modelo de ratón inmunodeficiente puede ser un modelo de xenoinjerto.
- 20 En la presente se divulgan:
- 1) Un ratón lampiño, inmunodeficiente en un antecedente diabético no obeso (NOD) que tiene célula B, célula T, célula NK, macrófago y deficiencia de complemento.
 - 2) El ratón de la cláusula 1, en cuyo caso el ratón es homocigótico para un alelo de Prkdc.
 - 3) El ratón de la cláusula 2, en el cual el alelo de Prkdc es scid (Prkdc^{scid}).
 - 25 4) El ratón de cualquiera de las cláusulas 1 a 3, en cuyo caso el ratón es homocigótico para un alelo de Hr.
 - 5) El ratón de la cláusula 4, en el cual el alelo de Hr es hr (Hr^{hr}).
 - 6) El ratón de cualquiera de las cláusulas 1 a 5, en cuyo caso el antecedente diabético no obeso es NOD.CB17-Prkdc^{scid}.
 - 7) El ratón de cualquiera de las cláusulas 1 a 5, en el cual el antecedente diabético no obeso es NOD.CB17-Prkdc^{scid}/NCRHsd.
 - 30 8) El ratón lampiño de cualquiera de las cláusulas 1 a 7 que tiene además una deficiencia de célula dendrítica, en cuyo caso la deficiencia de célula dendrítica es una reducción en la cantidad de células dendríticas en comparación con un ratón inmunodeficiente del mismo antecedente que no es lampiño.
 - 9) Un método para producir un ratón lampiño, inmunodeficiente en un antecedente diabético no obeso (NOD), y el método comprende:
 - 35 (a) cruzar una cepa de ratón NOD scid homocigótica para alelo de Prkdc con una segunda cepa de ratón homocigótica para un alelo de Hr para producir progenie heterocigótica tanto para el alelo de Hr como para el alelo de Prkdc;
 - (b) intercruzar la progenie heterocigótica producida en el paso (a) con ratones NOD scid;
 - (c) seleccionar crías del paso (b) que son homocigóticas para el alelo de Prkdc y tienen un genotipo que es más similar a NOD scid;
 - 40 (d) cruzar la cría seleccionada en el paso (c) con ratones homocigóticos o heterocigóticos para el alelo de Hr.
 - 10) El método de la cláusula 9 en el cual el alelo de Prkdc es scid (Prkdc^{scid}).
 - 11) El método de cualquiera de las cláusulas 9 a 10 en el cual el alelo de Hr es hr (Hr^{hr}).
 - 12) El método de cualquiera de las cláusulas 9 a 11, en el cual la progenie producida en el paso (a) es genotipada usando un proceso seleccionado del grupo que consiste en:

discriminación alélica de polimorfismo de nucleótido único, reacción en cadena de polimerasa y evaluación por perfil de polimorfismo de nucleótido único.

13) El método de cualquiera de las cláusulas 9 a 12, en el cual el ratón NOD scid de los pasos (a) y (b) es un ratón NOD.CB17-Prkdc^{scid}.

5 14) El método de cualquiera de las cláusulas 9 a 12, en el cual el ratón NOD scid de los pasos (a) y (b) es un ratón NOD.CB17-Prkdc^{scid}/NCrHsd-Prkdc^{scid}.

15) El método de cualquiera de las cláusulas 9 a 14 en el cual la cepa del segundo del paso (a) es un ratón MF-1-hr.

Breve descripción de los dibujos

10 Figura 1: muestra secciones de histología de nódulos linfáticos mesentéricos (parte superior) y bazo (parte inferior) de ratones NOD scid y Hr NOD scid machos y hembras.

Figura 2: muestran gráficos de puntos de los resultados de citometría de flujo (FACS) para CD49b. Los números en los cuadrantes son porcentajes medios.

Figura 3: muestra gráficos de puntos de resultados de citometría de flujo (FACS) para CD11c. Los números en los cuadrantes son porcentajes medios.

15 Figura 4: muestra gráficos de puntos de resultados de citometría de flujo (FACS) para CD3e y CD 49b. Los números en los cuadrantes son porcentajes medios.

Figura 5: muestra gráficos de puntos de resultados de citometría de flujo (FACS) para CD3e y CD49b. Los números en los cuadrantes son porcentajes medios.

20 Figura 6: muestra gráficos de puntos de resultados de citometría de flujo (FACS) para CD3e y CD8α. Los números en los cuadrantes son porcentajes medios.

Figura 7 muestra gráficos de puntos de resultados de citometría de flujo (FACS) para CD49b. Los números en los cuadrantes son porcentajes medios.

Figura 8 muestra gráficos de puntos de resultados de citometría de flujo (FACS) para CD49b. Los números en los cuadrantes son porcentajes medios.

25 Figura 9 muestra desarrollo tumoral de línea celular JEKO-1 de linfomas de células de manto humano, xenotransplantada en ratones Hr NOD scid.

Figura 10 muestra desarrollo tumoral de línea celular JEKO-1 de linfomas de células de manto humano, xenotransplantada en ratones desnudos atímicos.

30 Figura 11 muestra desarrollo tumoral de línea celular KARPAS-299 de linfoma de célula grande humana, xenotransplantada en ratones Hr NOD scid sin irradiación de cuerpo entero.

Descripción detallada

35 Mientras que la invención es susceptible a diversas modificaciones y a formas alternativas, en la presente se describirán detalladamente formas de realización específicas. Debe entenderse, sin embargo, que no existe un intento de limitar la invención a las formas particulares descritas, sino al contrario la intención es cubrir todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que caen dentro del alcance de la invención.

Los siguientes términos se usan por toda la especificación y están destinados a significar tal como se describe más adelante:

40 Tal como se usa en la presente, la frase "más similar a NOD scid" se refiere a ratones dentro de una generación particular que poseen un genotipo que es más similar a la cepa NOD scid que poseen otros ratones de la misma generación. Esto puede cuantificarse, por ejemplo, mediante análisis de polimorfismo de nucleótido único.

En la presente se divulga la producción de un ratón lampiño NOD scid. Los ratones lampiños NOD scid son particularmente ventajosos para experimentos de desarrollo e investigación biomédica utilizando trasplante de xenoinjerto, tumores

espontáneos, tumorigénesis celular cancerosa, angiogénesis tumoral, potencial metastásico tumoral, terapia de supresión tumoral, regulación de carcinogénesis, captación de imágenes de tumores y rendimiento de célula madre humana.

Ratón NOD scid

5 La mutación Prkdc^{scid} ha sido transferida desde el antecedente C.B-17 al antecedente diabético no obeso (NOD) susceptible a diabetes y se denomina NOD scid. El ratón mutante NOD scid fue recibido por el National Cancer Institute, Frederick, Maryland en 2004 del National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. Los NOD scid tienen inmunodeficiencia combinada severa (scid) que afecta el desarrollo de células T y B. A diferencia del ratón NOD típico, el desarrollo de diabetes autoinmune no ocurre debido a la falta de la función de células T. Los ratones NOD scid se caracterizan además por tener un déficit funcional de células NK, deficiencia de macrófagos y ausencia de complemento circulante. Los ratones NOD scid son susceptibles a patógenos oportunistas y tienen una incidencia incrementada de linfomas tímicos con la edad.

Ratón lampiño (Hr)

15 Los ratones homocigóticos (hr/hr) tienen un recubrimiento normal hasta aproximadamente 10 días de edad, tiempo en el cual comienza la pérdida de pelo. Aunque ocurre un crecimiento de pelo escaso a intervalos mensuales, los ratones son esencialmente lampiños a las 5-6 semanas de edad. Se pierde completamente el pelo desde el folículo (Crew y Mirskaia, 1931). Las vibrisas mudan repetidamente y se vuelven más anormales con la edad. El gen lampiño es un gen receptivo de hormona tiroides y co-represor para receptores de hormona tiroides, que media en la acción de hormona tiroides en el cerebro y en la piel (Potter et al., 2001). Sus uñas de los dedos son frecuentemente largas y curvadas.

20 Por lo general, no se requieren procedimientos zootécnicos para mantener ratones lampiños. Con excepción de abscesos ocasionales en la piel, generalmente no presentan susceptibilidad incrementada a la infección. Sin embargo, los ratones lampiños si tienen una leve inmunodeficiencia posiblemente debida a defectos de las células ayudantes T (Reske-Kunz et al., 1979). Existe una alta incidencia de leucemia en ratones hr/hr en comparación con ratones hr/+ (Heiniger et al., 1974) asociada a defectos inmunológicos y a la respuesta afectada de injerto-vs.-hospedero (GVH) (L'Anson y Gasser, 1973). Una asociación entre la función inmune defectuosa y la linfomagénesis en ratones lampiños puede deberse a la respuesta inmune reducida de este mutante a células singénicas de linfoma y a virus purificado de leucemia de murino (MuLVs) (Johnson y Meier, 1981). Adicionalmente, se ha mostrado que las células T esplénicas de este mutante tienen una respuesta proliferativa deprimida hasta aloantígenos de región I (Morrissey et al., 1980). Además, en los bazo se ha encontrado una inversión en las proporciones normales de células T de Ly-1+ y Ly-123+ (Reske Kunz et al., 1979).

30 Desde el punto de vista histopatológico, los ratones lampiños tienen hiperqueratosis de la parte superior del epitelio estratificado de los canales de pelo que inician en aproximadamente 14 días. La formación del tallo del cabello es anormal y la funda de raíz interna se une alrededor de la parte terminal del eje del cabello de modo que la parte inferior de la funda del cabello no logra seguir el tallo del cabello ascendente y queda varada en la dermis. Se desarrollan quistes desde dos fuentes, la parte superior hipercarótica de los canales del pelo y las fundas de los folículos anormales varados en la dermis (Fraser, 1946; Mann, 1971). Los cambios glomerulares en ratones lampiños han sido descritos por Fukui et al., 1975. Los ratones lampiños son fértiles pero la mayoría de las hembras no lactan bien a sus crías. La mayor parte del sistema de crianza efectiva usa machos mutantes homocigóticos y hembras heterocigóticos (ILAR, 1989).

40 La presencia de células NK, macrófagos y función de complemento puede influenciar el crecimiento tumoral inicial y la propagación metastásica después de la implantación de células tumorales. Un estudio comparativo de la tasa de crecimiento tumoral de diversas líneas celulares cancerosas hematopoyéticas en diferentes modelos animales muestra que la mejor tasa de crecimiento se logra en modelos con deficiencia de célula B, célula T, célula NK, macrófagos y de complemento tal como se exhibe en el modelo de ratón lampiño NOD scid. Adicionalmente, el ratón lampiño NOD scid tiene un potencial metastásico incrementado en relación con otros modelos de ratón ortotópicos. El ratón lampiño NOD scid es un modelo útil para trasplante xenográfico y estudios de humanización y tiene ventajas genéticas y fenotípicas en comparación con mutantes scid en otros antecedentes genéticos.

45 En un caso, se divulga un ratón lampiño, inmunodeficiente en un antecedente diabético no obeso (NOD). El ratón lampiño inmunodeficiente tiene una deficiencia de célula B, célula T, célula NK, macrófagos y complemento. Además, y de manera inesperada, el ratón lampiño inmunodeficiente tiene un déficit de célula dendrítica, en la cual la cantidad de células dendríticas se reduce en el ratón lampiño NOD scid en comparación con el ratón NOD scid que tiene pelo. Una reducción en las células dendríticas da lugar a un grado mayor de inmunodeficiencia que puede ser ventajoso para experimentos que involucran trasplantes de xenoinjerto, tumores espontáneos, tumorigénesis celular cancerosa, angiogénesis tumoral, potencial metastásico tumoral, terapia de supresión tumoral, regulación de carcinogénesis, captación de imágenes de tumores y rendimiento de célula madre humana.

EJEMPLOS

EJEMPLO. Crianza selectiva para producir ratones lampiños NOD scid.

Los ratones se crían tal como se muestra en la tabla 1. En resumen, los pasos son tal como siguen (la presencia de un alelo mutante se indica mediante el símbolo ⁺).

- 5 Paso (1): criar ratones homocigóticos lampiños (Hr ^{+/+}) con ratones homocigóticos NOD scid (Prkdc ^{+/+}). Los ratones Hr son preferiblemente machos porque las hembras Hr pueden presentar malas características maternas. Los ratones F1 producidos del paso 1 son todos heterocigóticos: Hr ^{+/-} y Prkdc ^{+/-}.
- 10 Paso (2): seleccionar machos NOD scid heterocigóticos y retrocruzarlos con hembras NOD scid Prkdc ^{+/+} homocigóticas. Los ratones N2 son una mezcla de genotipos. Ensayar crías para la presencia del gen Hr mediante PCR, para la presencia del gen Prkdc mediante discriminación alélica de polimorfismo de nucleótido único, y antecedente genético NOD scid mediante evaluación por perfil de polimorfismo de nucleótido único.
- 15 Paso (3): seleccionar machos y hembras con al menos 80.8% de antecedente genético NOD scid que son homocigóticos para Prkdc (Prkdc ^{+/+}) y heterocigóticos para Hr (Hr ^{+/-}) y crear los de manera correspondiente con machos o hembras NOD scid.
- 20 Paso (4): ensayar crías para la presencia del gen Hr mediante PCR y para el antecedente genético NOD mediante evaluación por perfil de polimorfismo de nucleótido único. Seleccionar machos y hembras con al menos 94% NOD scid de antecedente genético que son homocigóticos para Prkdc (Prkdc ^{+/+}) y heterocigóticos para Hr (Hr ^{+/-}) y crearlos de manera correspondiente con machos o hembras NOD scid.
- 25 Paso (5): ensayar crías para la presencia del gen Hr mediante PCR y para antecedente genético NOD scid mediante evaluación por perfil de polimorfismo de nucleótido único. Seleccionar machos y hembras con al menos 99% de antecedente genético NOD scid que son homocigóticos para Prkdc (Prkdc ^{+/+}) y heterocigóticos para Hr (Hr ^{+/-}) y crearlos de manera correspondiente con machos o hembras NOD scid.
- Paso (6): ensayar crías para la presencia del gen Hr mediante PCR y para antecedente genético NOD scid mediante evaluación por perfil de polimorfismo de nucleótido único. Seleccionar machos y hembras que tienen esencialmente 100% de antecedente genético NOD scid que son homocigóticos para Prkdc (Prkdc ^{+/+}) y heterocigóticos para Hr (Hr ^{+/-}) y crearlos de manera correspondiente con machos o hembras NOD scid.
- Paso (7): criar ratones obtenidos del paso 6 para establecer una colonia de ratones lampiños NOD scid. Los machos que son homocigóticos para Prkdc (Prkdc ^{+/+}) y homocigóticos para Hr (Hr ^{+/+}) pueden crearse con hembras que son homocigóticas para Prkdc (Prkdc ^{+/+}) y homocigóticas (Hr ^{+/+}) o heterocigóticas (Hr ^{+/-}) para Hr.

Tabla 1. Esquema de crianza para producir ratones lampiños NOD scid

Cruce	Ratones a aparearse	Discriminación alélica de SNP (scid)	PCR estándar PCR (hr)	Evaluación por perfil SNP	Comentarios	% de conversión de genoma esperado a antecedente de NOD
F1	Hembras NOD ^{scid} x machos MF-1-hr males	No	No	No	Crías heterocigóticas machos se eligen para N2 cruce para fijar cromosoma Y	50.0%

ES 2 601 800 T3

Cruce	Ratones a aparearse	Discriminación alélica de SNP (scid)	PCR estándar PCR (hr)	Evaluación por perfil SNP	Comentarios	% de conversión de genoma esperado a antecedente de NOD
N2	Hembras NOD ^{scid} x machos heterocigótico	Si	Si	Si	Las crías se ensayan para <i>scid</i> y <i>hr</i> . Hembras genéticamente más similares a NOD scid que son homocigóticas para <i>scid</i> y heterocigóticas para <i>hr</i> se eligen para N3 cruce para fijar cromosoma X. Desde este punto hacia delante, todos los reproductores futuros son homocigóticos para <i>scid</i> , luego no es necesario ensayar para este alelo.	80.8%
N3	Machos NOD ^{scid} x hembras <i>scid/scid hr/+</i> Y hembras NOD ^{scid} X machos <i>scid/scid hr/+</i>	No	Si	Si	Las crías se ensayan para <i>hr</i> . Machos y hembras que son al menos 80.8% NOD scid y son heterocigóticos para falta de pelo se eligen para apareamientos recíprocos en N4. Los machos mutantes pueden elegirse primero para apareamiento para incrementar el potencial de producción de crías.	94.0%
N4	Machos NOD ^{scid} x hembras <i>scid/scid hr/+</i> Y hembras NOD ^{scid} X machos <i>scid/scid hr/+</i>	No	Si	Si	Las crías se ensayan para <i>hr</i> . Machos y hembras que son al menos 94% Nod scid y son heterocigóticos para falta de pelo se eligen para apareamientos recíprocos en N5. Los machos mutantes pueden elegirse primero para apareamiento para incrementar el potencial de producción de crías.	99.0%
N5	Machos NOD ^{scid} x hembras <i>scid/scid hr/+</i> Y hembras NOD ^{scid} X machos <i>scid/scid hr/+</i>	No	Si	Si	Las crías se ensayan para <i>hr</i> . Machos y hembras que son al menos 99% NOD scid y se aparean conjuntamente para producir mutantes dobles homocigóticos y puede comenzar producción de colonia. Deben ocurrir apareamientos familiares completos después de este punto. Reproductores futuros de colonia inicial pueden ensayarse para <i>scid</i> y <i>hr</i> para confirmación final y archivo de datos.	100.0%

Opcionalmente, los ratones con mutaciones espontáneas o dirigidas del gen lampiño distinto del Hr^{hr} que dan lugar al fenotipo de falta de pelo pueden usarse, incluyendo pero sin limitarse a Hr^{rh} , Hr^{ba} , Hr^n , $hr^{rh\delta j}$, hr^{rhChr} , hr^{rhsl} , hr^{rhy} , hr^{bmnh} , y $hr^{TgN5053Mm}$.

Fenotipar ratones lampiños NOD.

- 5 Ratones lampiños NOD scid son pesados periódicamente para análisis de curva de crecimiento. Adicionalmente, los ratones reciben análisis químico estándar y pruebas completas de sangre y extendido de médula ósea. La citometría de flujo se usa para ensayar la presencia de marcadores de célula B y célula T, células NK, macrófagos y complemento. Otras pruebas incluyen histopatología en el timo, bazo, médula ósea y nódulos linfáticos, así como también piel (bolsa de grasa mamaria y demis).
- 10 También se realizan pruebas conocidas por aquellos versados en la materia para determinar la inmunodeficiencia de los ratones lampiños NOD scid, que incluyen examen de niveles de inmunoglobulina y células NK, macrófagos, y actividad de complemento. Los ratones también son monitoreados para la incidencia de linfoma espontáneo.

Tabla 2. Hemograma y niveles de inmunoglobulina en ratones lampiños NOD scid comparados con BALB/c y NOD scid

Ratón	Linfocitos /ul	IgG (conteos de MFI)	IgG (estimado ng/ul)
Macho Hr NOD scid	286	4622	2-5
Hembra Hr NOD scid	528	7563	2-5
Macho BALB/c	5308	16252	80
hembra BALB/c	8670	17575	80
macho NOD.scid	1857	7883	2-5
hembra NOD.scid	1809	6109	2-5

- 15 EJEMPLO. Conteo completo de sangre en ratones Hr NOD scid en comparación con ratones NOD scid

Se practicó eutanasia a ratones y se hicieron sangrar terminalmente para medición de hemograma y anticuerpo de suero (Ac). Se realizaron hemogramas rutinarios. Se midieron conteos de glóbulos blancos, glóbulos rojos y parámetros de placa en un analizador automático de hematología HEMAVET 950FS. Los diferenciales de glóbulos blancos se obtuvieron a partir de un extendido de sangre que se obtuvo en el momento de la toma de sangre. Los resultados de este diferencial manual se utilizaron para calcular cantidades estimadas de cada tipo de glóbulo blanco.

- 20

Tabla 3. Hemograma completo en ratones lampiños NOD scid en comparación con NOD scid

	Unidades	Hr NOD scid (hembras, 6-7 semanas; n=6)		NOD scid (machos, 6-7 semanas; n=5)	
		Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
Glóbulos blancos	x103/ μ L	3.6	1.0	4.2	0.8
Glóbulos rojos	M/ μ L	7.5	0.4	8.5	0.4
Hemoglobina	g/dL	8.2	1.9	13.0	0.5
Hematocrito	Vol%	41.8	1.8	47.4	3.0
MCV	fL	55.3	2.0	56.0	1.3
MCH	Pg	15.0	0.4	15.4	0.6
MCHC	g/dL	27.1	0.8	27.5	1.7
Neutrófilos segmentados	x103/ μ L	2.6	0.9	1.7	1.0
Neutrófilos segmentados	%	70.8	6.4	0	0
Linfocitos	%	20.2	8.5	27.8	16.4
Monocitos	%	6.5	3.8	4.4	3.2
Eosinófilos	%	0.1	.0.1	3.8	3.2
Conteo de plaquetas	x103	668.8	167.3	1018.40	116.9
MPV	fL	4.8	0.1	4.8	0.1

Histopatología

Se comparan índices histopatológicos entre ratones Hr NOD scid y NOD scid. Se cosecharon nódulos linfáticos axilares, inguinales, cervicales/mandibulares y mesentéricos, así como también bazo, timo, tejido de mamario, intestino ciego y pancreas. Se recogieron extendidos de médula ósea a partir de la médula ósea femoral y el esternón y el fémur para análisis histológico.

5

En ratones lampiños NOD scid, los nódulos linfáticos y la pulpa blanca esplénica aparecen desprovistos de células con morfología típica de linfocito (núcleo condensado, citoplasma escaso). Las células visibles restantes son células de soporte reticular, células dendríticas, macrófagos y células NK. En grados variables de hematoposis en la pulpa roja esplénica.

Marcadores inmunocelulares

10 EJEMPLO. Inmunoglobinas. El anticuerpo de suero fue medido mediante inmuno-ensayo fluorescente de analito múltiple (MFI). Todas las mediciones de IgG para ratones Hr NOD scid fueron de menos de 6.25mg/mL, o por debajo del umbral para filtración en modelos SCID.

15 EJEMPLO. Clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de antígenos de superficie sobre esplenocitos. Los antígenos de superficie celular fueron analizados para determinar el tipo y el nivel de déficit inmuno celulares en ratones Hr NOD en comparación con ratones NOD scid.

Materiales y métodos

20 Cosecha de esplenocito. Bazos recién retirados se colocan en una placa de petri que contienen 2 ml de RPMI-10 completo (450 ml de RPMI-1640, 50MI FBS, 7.5 ml de HEPES de 1M, pH7.2). Los bazos son cortados con una hoja de bisturí en varios sitios. Usando un movimiento circular, los pedazos de bazo se presionan contra el fondo de la placa de Petri con el émbolo de una jeringa de 5 ml hasta que queda tejido fibroso en su mayor parte. Los grumos se proporcionan adicionalmente a la suspensión sacando y expulsando la suspensión varias veces a través de una jeringa de 5 ml con una aguja de 20 g. La suspensión se expulsa a un tubo de polipropileno 12 x 75 mm Falcon a través de un filtro de las células.

25 Remoción de glóbulos rojos. Se adicionan dos mililitros de PHARM LYSE (diluido 1:10 en agua Milli-Q) a la suspensión de esplenocito. Luego la suspensión es sometida inmediatamente a vórtex y se incuba por 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Luego la suspensión es centrifugada a 200 x g durante 5 minutos a 4 °C. Sin perturbar la pastilla, el sobrenadante se vierte cuidadosamente y el borde del tubo de ensayo se seca sobre una toalla de papel. Después la pastilla es resuspendida en 1 ml de regulador de pH frío de tinción. La suspensión se pasa a través de un filtro de células a tubo de polipropileno de 12 x 75 mm FALCON que se mantiene sobre hielo.

30 Conteos de células. Se adicionan cincuenta microlitros de Trypan Blue, 90 µl de regulador de pH de tinción, y 10 µl de suspensión de células a tubo eppendorf 0.5 ml. Después de mezclar exhaustivamente, se cargan 30 µm a hemacitómetro. Se cuentan las células viables sobre un objetivo de 10X (las células viables parecen refractantes, mientras que las células muertas son azules). La pastilla se centrifuga luego a 350 x g por 5 minutos y luego es resuspendida hasta un volumen final adecuado (1 x 10⁶ células por 200 µl demuestra para análisis de FACS) y se ponen en alícuotas a tubos de 1.5 ml.

35 Inmuno-tinción fluorescente para antígenos de superficie de célula. Las células son inmunotinturadas con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo específicos para un antígeno de superficie de célula. Las células se incuban con anticuerpos durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad. Luego se convierten en pastillas mediante centrifugación a 500 x 5 por 5 minutos, seguida de resuspensión en 500 µl de regulador frío de pH de tinción y se transfieren a tubos de poliestireno de 12 x 75 mm FALCON. Los grumos visibles se retiran antes del análisis FACS.

Tabla 4. Los anticuerpos son tal como siguen:

Producto BD #	Descripción	Lote #	[Ab]	Operativo [Ab]	Dilución	ul para adicional r
553047	CD4, FITC	62786	0.5 mg/ml	0.06 mg	1:10	1.2
557399	CD 19, PE	52658	0.2 mg/ml	0.06 mg	1:10	3.0
553858	DX5/CD49B, PE	34389	0.2 mg/ml	1.0 mg	Ninguna	5.0
553033	CD8α, PE	64081	0.2 mg/ml	0.06 mg	1:10	3.0
553066	CD3e, APC	60549	0.2 mg/ml	1.0 mg	Ninguna	5.0
550261	CD11c, APC	62529	0.2 mg/ml	0.25 mg	Ninguna	1.25
553047	CD4, FITC	62786	0.5 mg/ml	0.06 mg	1:10	1.2

Producto BD #	Descripción	Lote #	[Ab]	Operativo [Ab]	Dilución	ul para adicional
553066	CD3e, APC	60549	0.2 mg/ml	1.0 mg	Ninguna	5.0
553033	CD8 α , PE	64081	0.2 mg/ml	0.06 mg	1: 10	3.0
553066	CD3e, APC	60549	0.2 mg/ml	1.0 mg	Ninguna	5.0
553858	DX5/CD49B PE	34389	0.2 mg/ml	1.0 mg	Ninguna	5.0
553066	CD3e, APC	60549	0.2 mg/ml	1.0 mg	Ninguna	5.0
553929	CD4:RatIgG2a, FITC	40513	0.5 mg/ml	1.0 mg	Ninguna	2.0
553930	CD19:Rat IgG2a, PE	58248	0.2 mg/ml	1.0 mg	Ninguna	5.0
553943	DX5:Rat IgM, PE	55080	0.2 mg/ml	1.0 mg	Ninguna	5.0
(553930)	Same as CD 19 IC					
553974	Ham, IgG1k, APC	66673	0.2 mg/ml	1.0 mg	Ninguna	5.0
553956	Ham, IgG1 λ , APC	62842	0.2 mg/ml	1.0 mg	Ninguna	5.0

Resultados

El análisis de citometría de flujo confirmó que los ratones Hr NOD scid carecían casi completamente de células T y de células B. CD19, un marcador común de linaje de células B mostró que ambas cepas carecían casi completamente de células B maduras (Fig. 5). Los ratones Hr NOD scid tenían menos linfocitos en total que los ratones NOD scid. En particular, las células NK (Fig. 2) y las células dendríticas (Fig. 3) en los ratones Hr NOD scid decrecieron ostensiblemente en comparación con los ratones NOD scid. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las subpoblaciones de células T y NK, así como también las células dendríticas de ambas cepas. Los datos de citometría de flujo se analizaron en ANOVA de dos vías utilizando SAS. Los valores P de 0.05 o menos eran indicativos de una varianza significativa (Hr NOD scid, n = 12; NOD scid, n = 10).

Se usa tinción positiva para antígenos de superficie de célula de la tabla de más adelante para distinguir diversos tipos de células inmunes.

Tabla 5

Antígeno de superficie de célula	Tipo de célula
CD3e	Células T
CD4	Células T ayudantes
CD8 α	Células T citotóxicas
CD11c	Células dendríticas
CD19	Células B
CD49b	Células NK

15 EJEMPLO. Xenoinjerto de líneas celulares tumorigénicas.

Las líneas celulares tumorigénicas derivadas de cánceres de vejiga, pecho, cabeza y cuello, colon, sangre, hígado, pulmón, melanoma, ovario, páncreas, próstata o testículos se trasplantan a ratones lampiños NOD scid de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Las siguientes líneas celulares se ensayaron para su capacidad de ser absorbidas y cultivadas en ratones lampiños NOD scid: HTLA-230 (Brignole et al., 2004), CT-26 (Guba et al., 2001), BW5147 (Geldhof et al., (1998), Grant 519 (Wang et al., 2007), Karpas 299 (Francisco et al., 2003), L540cy (Francisco et al., 2003, Colo-699 (Boehle et al., 2001), SIT1 (Bromberg et al., 2005), TAC 7 (Bromberg et al., 2005), DU-145 (Glinskii et al., 2005).

La línea celular de linfoma de célula grande humana KARPAS-299 y la línea celular de linfoma de células de manto JEKO-1 son compradas en ATCC. Las células KARPAS-299 son cultivadas en RPMI 1640 con 10% de FBS; las células JEKO-1 también en RPMI 1640, con 20% de FBS. A los ratones hembras aproximadamente a las ocho semanas de edad se inoculan por vía subcutánea 1.0×10^7 células con Matrigel en una dilución de 1:1 con suspensión celular.

La línea celular KARPAS-299 no crecerá en ratones atímicos sin irradiación de cuerpo entero. En contraste, el modelo Hr NOD exhibió un crecimiento robusto con inyección subcutánea sin irradiación (Fig. 11). La línea celular tumoral JEKO-1 puede trasplantarse exitosamente a ratones desnudos atímicos se irradien o no antes de la inoculación, aunque la proliferación inicial es lenta. En este estudio, los ratones desnudos atímicos tenían aproximadamente 25-27 días de retraso del crecimiento de fase logarítmica (Fig. 9), mientras que el ratón Hr NOD scid mostró un crecimiento rápido y vigoroso (Fig. 10). Efectivamente, todos los ratones Hr NOD scid desarrollaron tumores dentro de 14 días después de la inoculación.

Las líneas celulares adicionales se ensayan para absorción y crecimiento en ratones lampiños NOD scid e incluyen: U251-NG, MCF-7, MDA-MB-231, T47D, CX-1, DLD-1, HAC-7, HC116, HT-29, FaDu, HNX-OE, A549, H322, H358, LL2, NCI-8460, NCIN417, B16F10, MOT, OVCAR3, CFPAC-1, Colo57, MlaPaca-2, PANC-1, PL45, CWR22, LNAI, PC-3, NCCIT, T24, G55, U87MG, SH-SY5Y, MCF-7, MT-1, HPB-ALL, HepT1, Hep3B, HuH6, y SKOV3. También se ensaya la capacidad de otros tipos de células de prosperar después de implantación, tal como las células madre (que expresan CD34).

Otras cepas de ratón tales como NOD scid, atímicos desnudo, MF-1 lampiño, CB.17, BALB/c y similares pueden estar incluidas en experimentos para propósitos comparativos.

Usando metodologías de retrocruzamiento asistida con marcador de polimorfismo de nucleótido único (SNP), ha sido transferida una mutación lampiña (Hr^{hr}) desde un ratón exogámico HsdOla:MF1-Hr^{hr} al ratón NOD.CB17-Prkdc^{scid}/NcrHsd para generar el ratón lampiño endogámico NOD.Cg-Prkdc^{scid} Hr^{hr}/NcrHsd, llamado comúnmente NOD scid lampiño. Las características inmunológicas de este modelo se describen en la presente, las cuales incluyen deficiencia de células B y T, un déficit funcional de células NK, y macrófago y función de complemento disminuidos. Adicionalmente en la presente se ha descubierto que las células NK y las células dendríticas se reducen sustancialmente en ratones Hr NOD scid en comparación con los ratones NOD scid.

Mientras que la invención ha sido ilustrada y descrita detalladamente en la descripción precedente, tales ilustración y descripción deben considerarse como un ejemplo y no con carácter restrictivo; se entiende que sólo se han descrito las formas de realización ilustrativas y que se desea proteger todos los cambios y modificaciones que vengán dentro del alcance de la invención. Aquellas personas con habilidad media en la técnica pueden concebir fácilmente sus propias implementaciones que incorporan una o más de las características descritas en la presente y que de esta manera caen dentro del alcance de la presente invención.

Referencias:

Baersch G, Mollers T, Hotte A, Dockhorn-Dworniczak B, Rube C, Ritter J, Jurgens H, Vormoor J (1997) Good engraftment of B-cell precursor ALL in NOD-SCID mice. *Klin Padiatr* 209:178-85.

Bastide C, Bagnis C, Mannon P, Hassoun, J, y Bladou F (2002) A Nod Scid mouse model to study human prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 5:311-5.

Boehle AS, Kurdow R, Schulze M, Kliche U, Sipos B, Soondrum K, Ebrahimnejad A, Dohmann P, Kalthoff H, Henne-Bruns D, Neumaier M (2001) Human endostatin inhibits growth of human non-small-cell lung cancer in a murine xenotransplant model. *Int J Cancer* 94(3):420-8.

Bosma MJ, y Carroll AM (1991) The Scid Mouse Mutant: Definition, Characterization, and Potential Uses. *Ann. Rev. Immunol.* 9:323-50.

Brignole C, Pastorino F, Marimpietri D, Pagnan G, Pistorio A, Allen TM, Pistoia V, y Ponzoni M (2004) *J. Natl. Cancer Inst.* 96:1171-1180.

Bromberg ME, Konigsberg WH, Madison JF, Pawashe A, Garen A (2005) Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8205-8209.

Christianson SW, Greiner DL, Schweitzer IB, Gott B, Beamer GL, Schweitzer PA, Hesselton RM, Shultz LD (1996) Role of natural killer cells on engraftment of human lymphoid cells and on metastasis of human Tlymphoblastoid leukemia cells in C57BL/6J-scid mice y in C57BL/6J-scid bg mice. *Cell Immunol* 171: 186-199.

Crew FAE y Mirskaia L (1931) The character "hairless" in the mouse. *J. Genet.* 25:17-24.

Francisco JA, Cerveny CG, Meyer DL, Mixan BJ, Klussman K, Chace DF, Rejniak SX, Gordon KA, DeBlanc R, Toki BE, Law CL, Doronina SO, Siegall CB, Senter PD, y Wahl AF (2003) cAC10-vcMMAE an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood* 102(4):1458-1465.

- Fraser FC (1946) The expression and interaction of hereditary factors producing hypotrichosis in the mouse: Histology and experimental results. *Canad. J. Res.* 24:10-25.
- Fukui M, Ito K, Kawamura S, Sudo K, Susuki K, Shimizu F (1975) Glomerular changes in hairless mice: a light, immunofluorescent and electron microscopic study. *Japan J. Exp. Med.* 45:535-540.
- 5 Geldhof AB, Van Ginderachter J, Vyersteen P, Raes G, De Baetselier P (1998) Multiple effects of transfection with interleukin 2 and/or interferon gamma on the behavior of mouse T lymphoma cells. *Clinical & Experimental Metastasis* 16(5):447-59.
- Glinskii OV, Huxley VH, Glinsky GV, Pienta KJ, Raz A, Glinsky VV (2005) Mechanical entrapment is insufficient and intercellular adhesion is essential for metastatic cell arrest in distant organs. *Neoplasia* 7(5):522-27.
- Greiner DL, Hesselton RA, Shultz LD (1998) SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells* 16(3):166-77.
- 10 Guba M, Cernaianu G, Koehl G, Geissler EK, Jauch KW, Anthuber M, Falk W, Steinbauer M (2001) A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 61(14):5575-79.
- Heiniger HJ, Meier H, Kalis N, Cherry M, Chen HW, Stoner RD (1974) Hereditary immunodeficiency and leukogenesis in HRS/J mice. *Cancer Res.* 34:201-211.
- 15 Institute for Laboratory Animal Research (1989) Immunodeficient rodents. A guide to their immunobiology, husbandry, and use. National Academy Press, Washington DC.
- Johnson DA, Meier H (1981) Immune responsiveness of HRS/J mice to syngeneic lymphoma cells. *J. Immunol.* 127:461-464.
- L'Anson VA y Gasser DL (1973) Relationship between graft-vs-host reactivity and possession of the high leukaemia genotype hr/hr. *J. Immunol.* 111:1604-1611
- 20 Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JCY, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao XL, Kato I, Williams DA, y Dick JE (1996) Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat. Med.* 2:1329-37.
- Lyon MF, Rastan S. y Brown SDM. (Eds). (1996) Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse. Third Edition, Volume 1. Oxford: Oxford University Press.
- 25 Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, y Tochino Y (1980) Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Exp. Anim.* 29:1-8.
- Mann SJ (1971) Hair loss and cyst formation in hairless and rhino mutant mice. *Anat. Rec.* 170:485-500.
- Morrisey PJ, Parkinson DR, Schwartz RS, Waksal SD (1980) Immunological abnormalities in HRS/J mice. I. Specific deficit in T lymphocyte helper function in a mutant mouse. *J. Immunol.* 125:1558-1562.
- 30 Nonoyama S, Smith FO, Bernstein ID, Ochs HD (1993) Strain-dependent leakiness of mice with severe combined immune deficiency. *J Immunol* 150:3817-24.
- Pelsue SC, Leif J, Rajan TV (1995) Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-scid/scid mice as compared with C.B-17-scid/scid mice. *Am J Path* 146:888-902.
- Potter GB, Beaudoin GM 3rd, DeRenzo CL, Zarach JM, Chen SH, Thompson CC (2001) The hairless gene mutated in congenital hair loss disorders encodes a novel nuclear receptor corepressor. *Genes Dev.* 15(20):2687-2701.
- 35 Reske-kunz AB, Scheid MP, y Boyse EA (1979) Disproportion in T-cell subpopulations in immunodeficient mutant hr/hr mice. *J Exp Med* 149:228-233.
- Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, y Greiner DL (1995) Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol.* 154:180-91.
- 40 Wang JCY, Lapidot T, Cashman JD, Doedens M, Addy L, Sutherly DR Nayar R, Laraya P, Minden M, Keating A, Eaves AC, Eaves CJ, Dick JE (1998) High level engraftment of NOD/SCID mice by primitive normal and leukemic hematopoietic cells from patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood* 91(7):2406-2414.

Wang M, Zhang L, Han X, Yang J, Qian J, Hong S, Samaniego F, Romaguera J, y Yi Q (2007) Atiprimod inhibits the growth of mantle cell lymphoma in vitro and in vivo and induces apoptosis via activating the mitochondrial pathways. *Blood* 109:5455-5462.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para incrementar la inmunodeficiencia de un modelo de ratón inmunodeficiente que tiene una mutación homocigótica Prkdc^{scid} en un antecedente diabético no obeso (NOD.CB17-Prkdc^{scid}) y que tiene pelo, transfiriendo una mutación homocigótica Hr^{hr} al ratón, en cuyo caso el modelo de ratón inmunodeficiente que tiene una inmunodeficiencia incrementada es lampiño y tiene una reducción en la cantidad de células dendríticas en comparación con el modelo de ratón NOD.CB17-Prkdc^{scid}.
2. Uso de la mutación Hr^{hr} para incrementar la inmunodeficiencia de un modelo de ratón inmunodeficiente que tiene una mutación homocigótica Prkdc^{scid} en un antecedente diabético no obeso (NOD.CB17-Prkdc^{scid}) y que tiene pelo, reduciendo la cantidad de células dendríticas en el ratón.
- 10 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o un uso de acuerdo con la reivindicación 2, en los cuales el ratón inmunodeficiente o el modelo de ratón inmunodeficiente es un modelo de xeno-injerto.

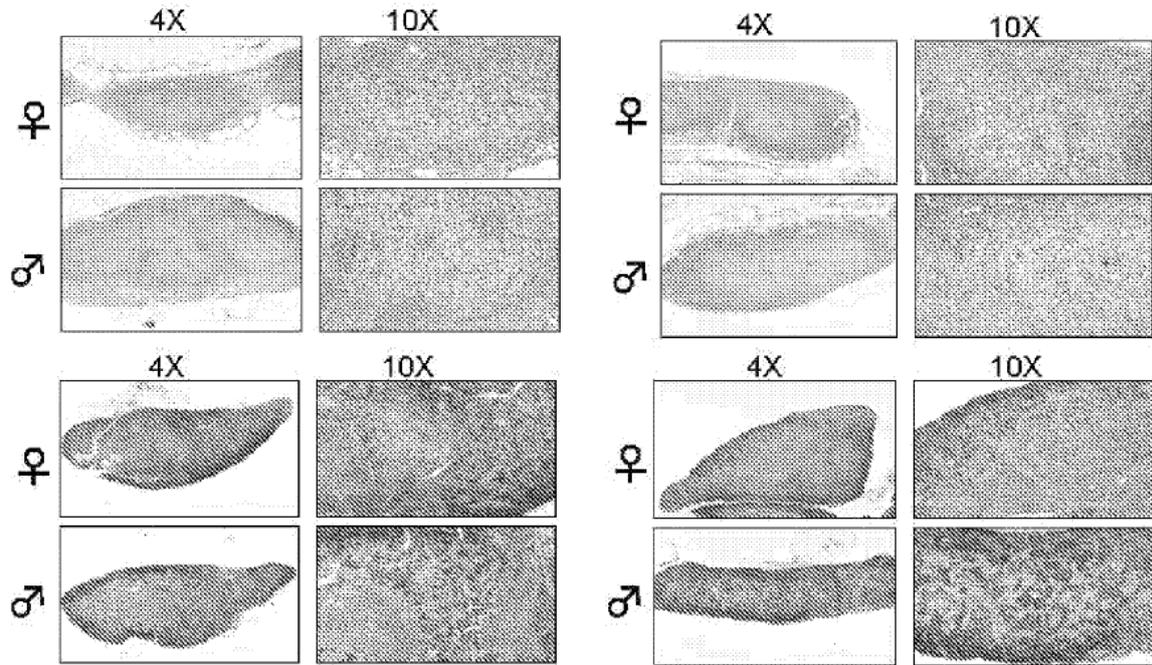


Fig.1

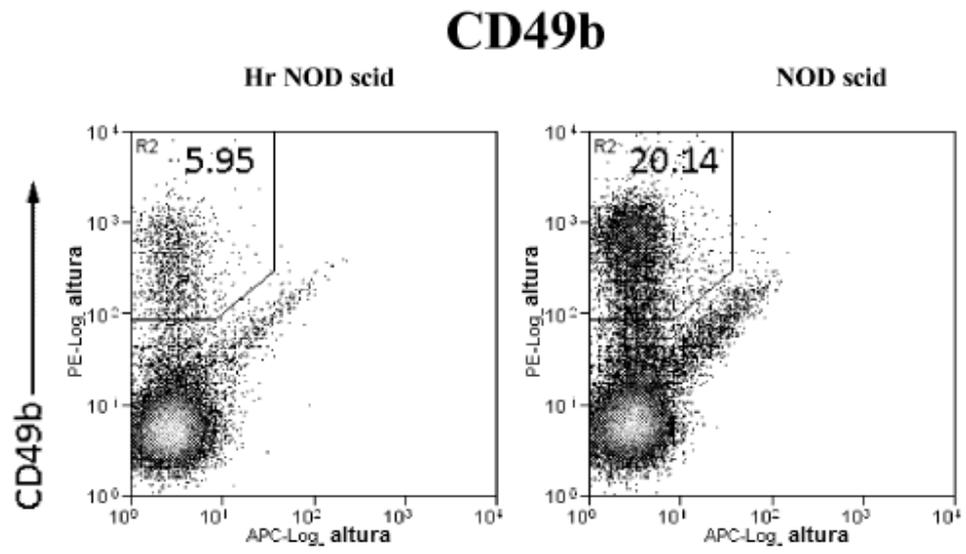


Fig. 2

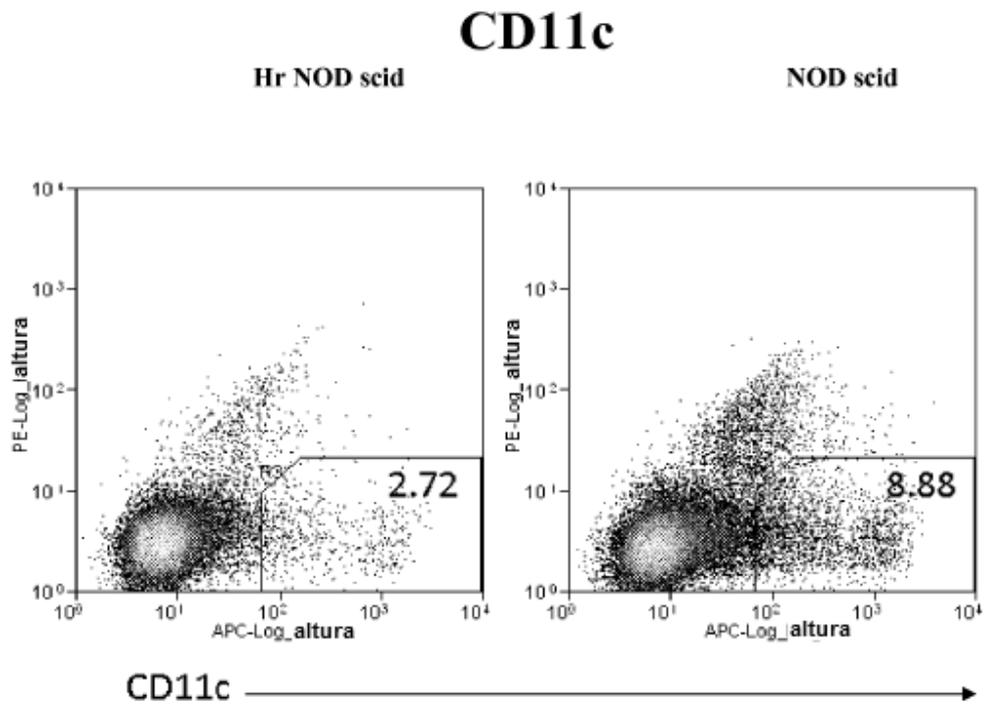


Fig. 3

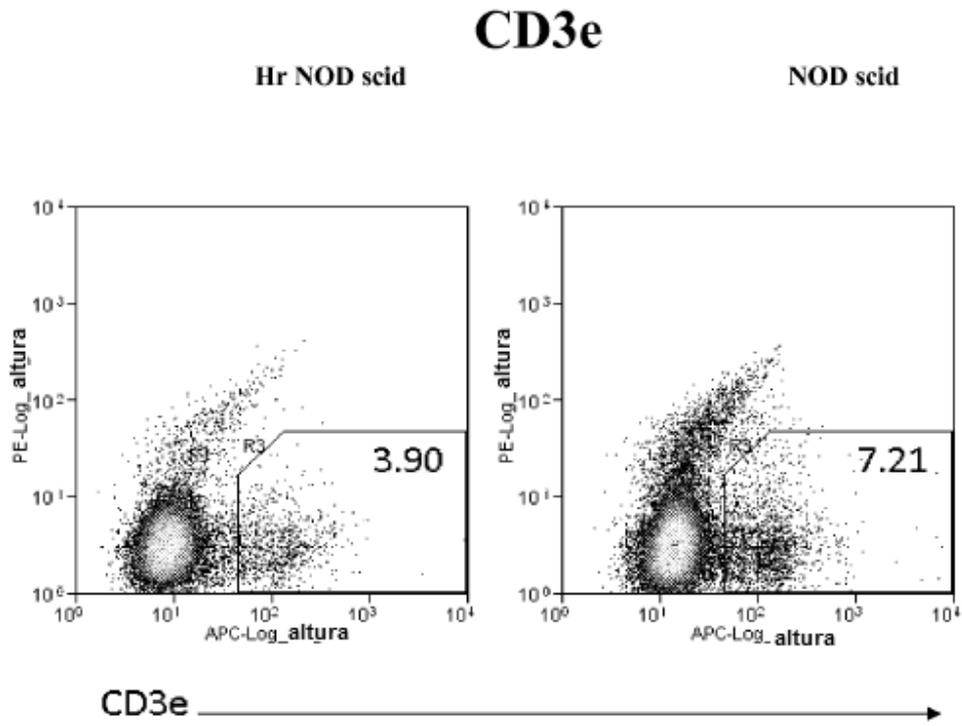


Fig. 4

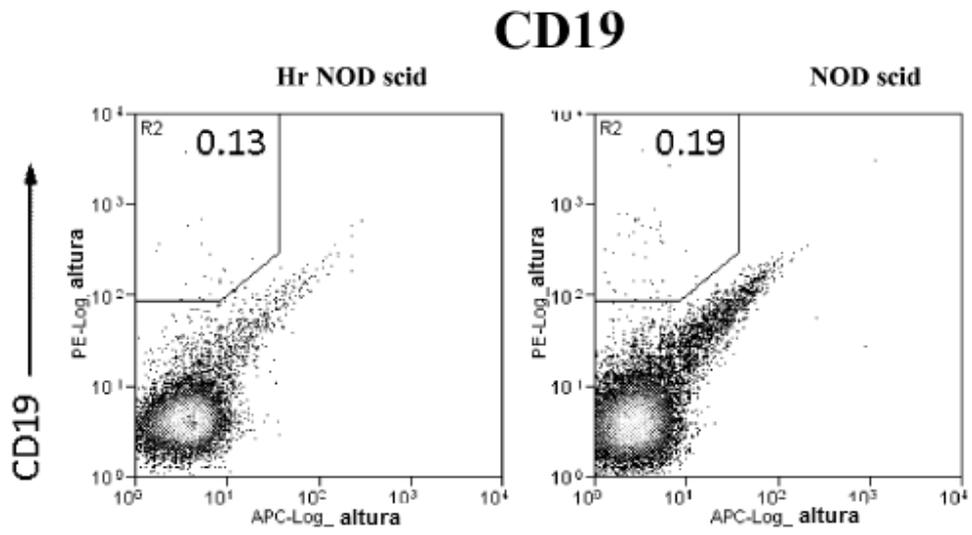


Fig. 5

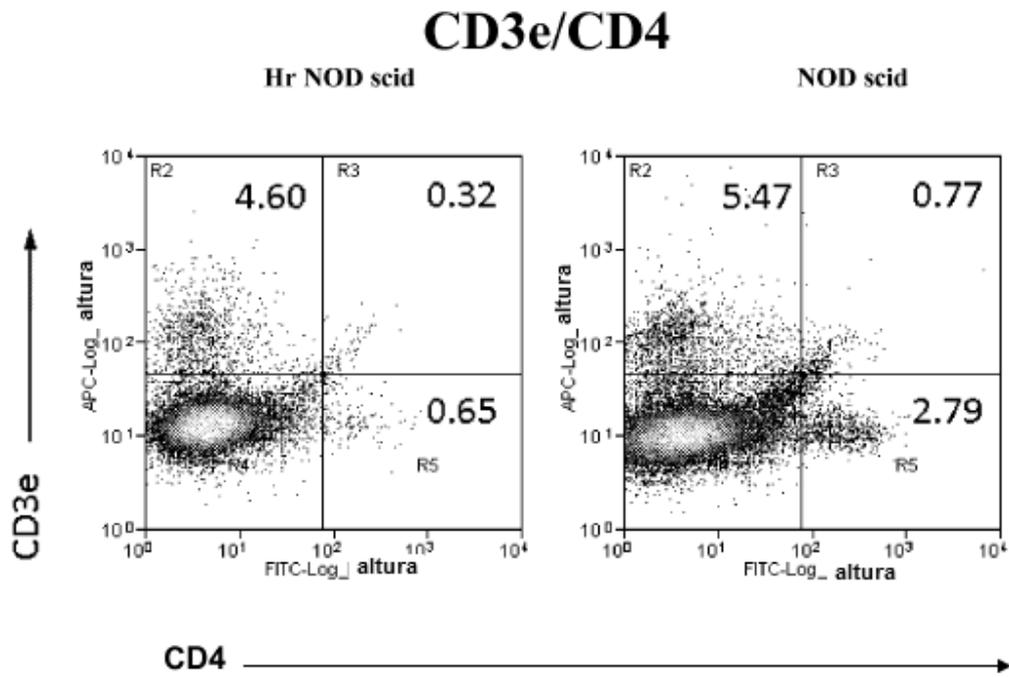


Fig. 6

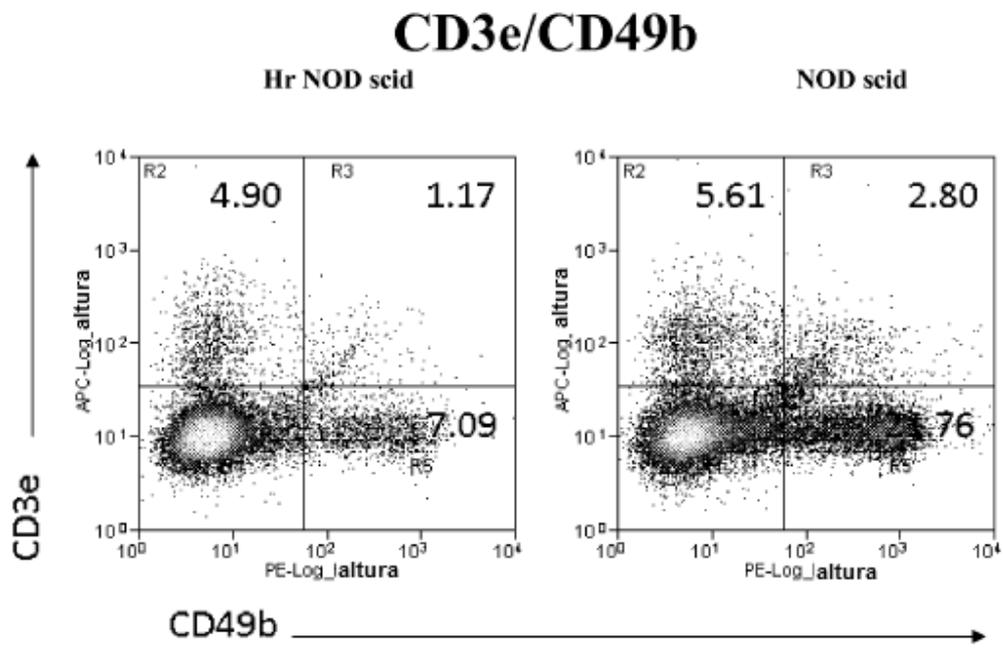


Fig. 7

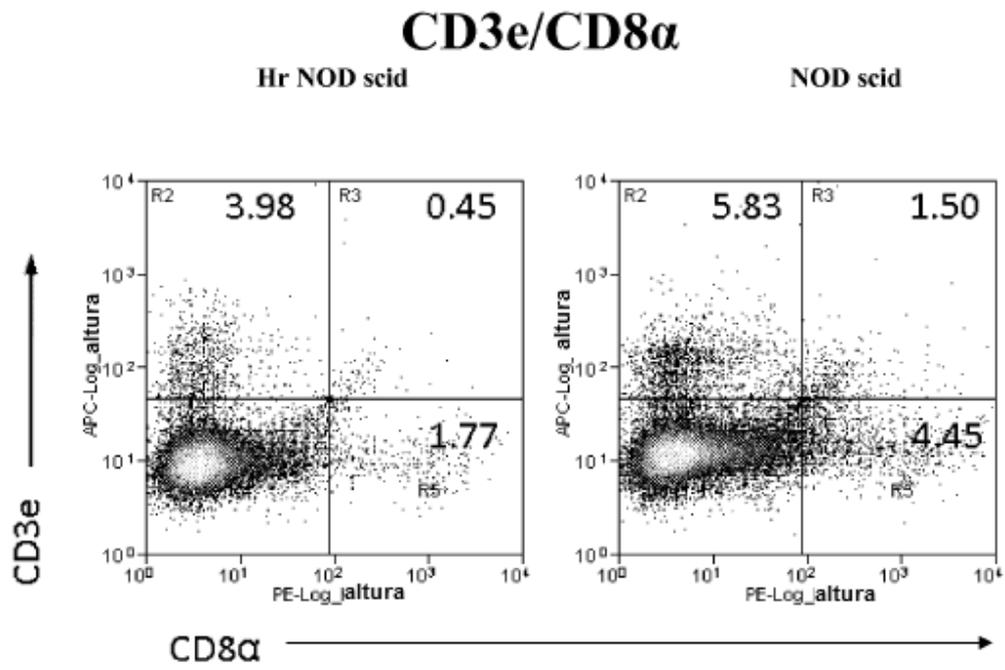


Fig. 8

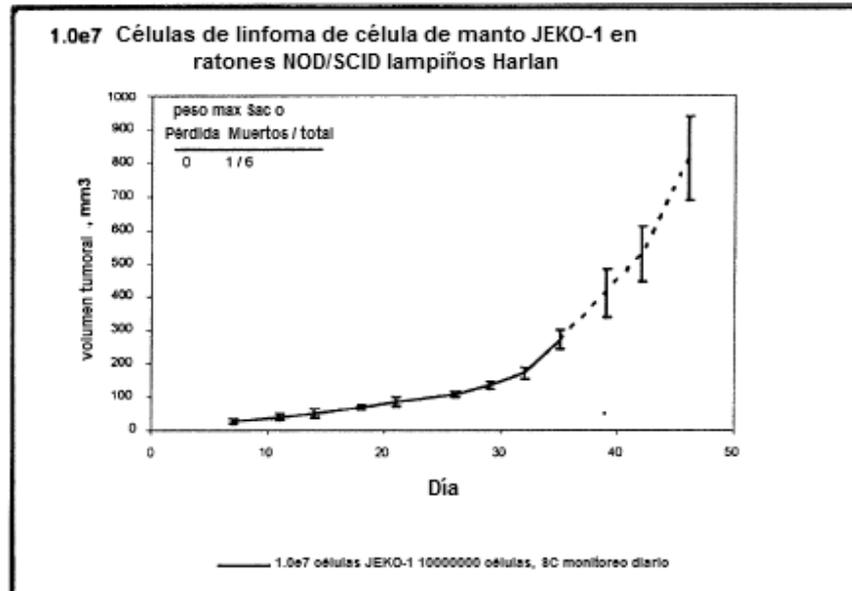


Fig. 9

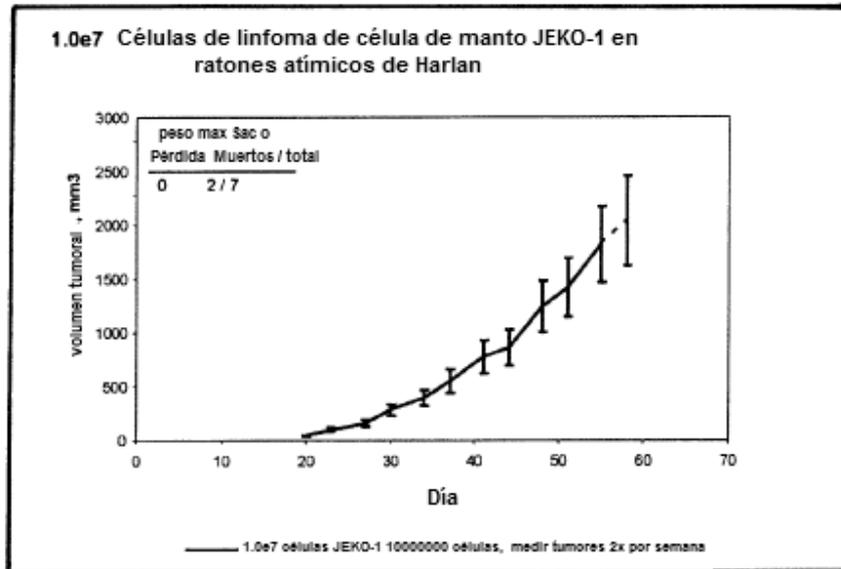


Fig. 10

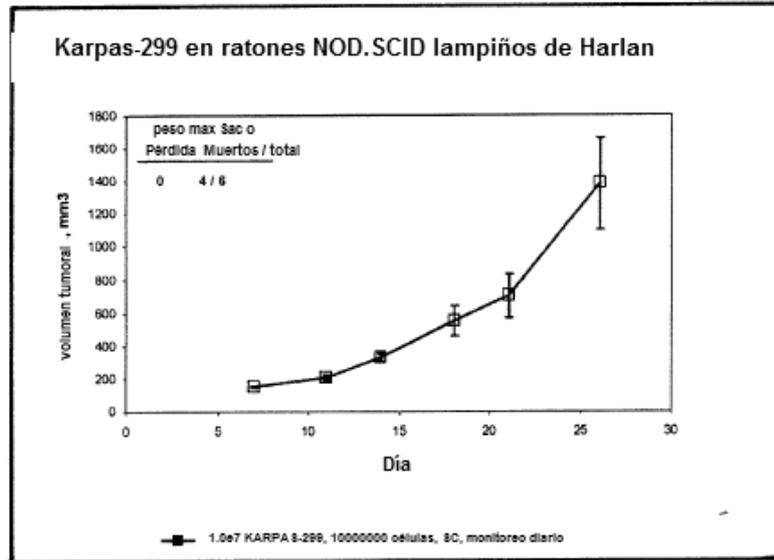


Fig. 11