

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 442**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/535 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2013 PCT/US2013/068569**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14071397**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2013 E 13811637 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2914102**

54 Título: **Animales no humanos modificados genéticamente y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

05.11.2012 US 201261722437 P

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

20.02.2018

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (33.3%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown NY 10591, US;
YALE UNIVERSITY (33.3%) y
INSTITUTE FOR RESEARCH IN BIOMEDICINE
(IRB) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**FLAVELL, RICHARD;
STROWIG, TILL;
MANZ, MARKUS G.;
BORSOTTI, CHIARA;
DHODAPKAR, MADHAV;
MURPHY, ANDREW J.;
STEVENS, SEAN y
YANCOPOULOS, GEORGE D.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 655 442 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 modificados genéticamente y métodos de uso de los mismos

5 Declaración con respecto a la investigación o desarrollo de patrocinio federal

La presente invención se preparó con apoyo oficial en virtud del número de subvención 5R01CA156689-04 concedido por los Institutos Nacionales de la Salud (NIH). El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

10 Remisión a solicitudes relacionadas

Conforme a 35 U.S.C. § 119 (e), la presente solicitud reivindica prioridad a la fecha de registro de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Serie No. 61/722.437 registrada el 5 de noviembre de 2012.

15 Antecedentes de la invención

El objetivo de la investigación biomédica es comprender mejor la fisiología humana y aplicar ese conocimiento en la prevención, tratamiento o curación de enfermedades humanas. Como consecuencia de las barreras prácticas y éticas asociadas a la experimentación con seres humanos, muchos estudios se llevan a cabo con modelos de animales pequeños, como ratones. Así pues, se necesitan modelos de animales de estas enfermedades humanas.

Por ejemplo, en los Estados Unidos, anualmente se diagnostican en torno a 20.000 nuevos casos de pacientes con mieloma múltiple (MM), un cáncer incurable en la mayoría de los casos, de linfocitos B terminalmente diferenciados que secretan anticuerpos (Hideshima et al., 2007, Nat Rev Cancer. 7:585-98; Kuehl and Bergsagel, 2002, Nat Rev Cancer. 2:175-87). MM se caracteriza por la infiltración de células plasmáticas malignas en la médula ósea (MO) y las manifestaciones clínicas incluyen enfermedad ósea, hipercalcemia, citopenia, disfunciones renales y neuropatía periférica (Hideshima et al., 2007, Nat Rev Cancer. 7:585-98; Kuehl and Bergsagel, 2002, Nat Rev Cancer. 2:175-87). En la mayoría de los casos, MM va precedido de un estado pre maligno denominado gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) que afecta a cerca de un 3% de las personas de edad superior a 50 años (Landgren et al., 2009, Blood 113:5412-7). Las anomalías genéticas heterogéneas complejas se caracterizan por células MM que incluyen cambios en el cariotipo y translocaciones de IgH (Kuehl and Bergsagel, 2002, Nat Rev Cancer. 2:175-87; Zhan et al., 2006, Blood 108:2020-8). Se cree que los clones de células plasmáticas que se amplifican en GMSI tienen perfiles genéticos y fenotípicos similares a las células plasmáticas mielomatosas (Chng et al., 2005, Blood 106:2156-61; Fonseca et al., 2002, Blood 100:1417-24 Kaufmann et al., 2004, Leukemia. 18:1879-82). Si bien, se ha señalado que las mutaciones de los genes de ciclina D accionan el desarrollo de MM, no se han demostrado de forma concluyente la posible contribución de otros factores (Bergsagel et al., 2005, Blood 106:296-303). No obstante, las alteraciones genéticas hereditarias no son los únicos determinantes del comportamiento de las células MM. Por el contrario, la resistencia a los fármacos y las respuestas biológicas aberrantes a las citoquinas están fuertemente influidas por las interacciones con el microentorno lo que ofrece una oportunidad para desarrollar nuevos tratamientos terapéuticos.

Al igual que muchos otros tumores, MM se caracteriza por poblaciones células heterólogas que interactúan intensamente con otras células del estroma no malignas que crean un entorno propicio (De Raeve and Vanderkerken, 2005, Histol Histopathol. 20:1227-50; Dhodapkar, 2009, Am J Hematol. 84:395-6). El microentorno de la MO para células MM consiste en una matriz extracelular (MEC) diversa y componentes celulares tanto de origen hematopoyético como no hematopoyético. Aunque la MO proporciona un entorno protegido para la hematopoyesis normal, la interacción entre las células MM y las proteínas MEC y células accesorias desempeña un papel crucial en la patogénesis de MM (De Raeve and Vanderkerken, 2005, Histol Histopathol. 20:1227-50; Dhodapkar, 2009, Am J Hematol. 84:395-6; Hideshima et al., 2007, Nat Rev Cancer. 7:585-98). Las células del estroma, las células mieloides, los osteoclastos y los osteoblastos producen factores de crecimiento, como interleuquina 6 (IL-6), factor de activación de linfocitos B (BAFF), factor de crecimiento de fibroblasto y factor derivado de células estromales 1a que activa rutas de señales que median la migración, supervivencia y crecimiento de células MM. En particular, IL-6 producida por células del estroma, osteoclastos y células mieloides parece ser un factor crucial en las primeras etapas y la patogénesis de MM (De Raeve and Vanderkerken, 2005, Histol Histopathol. 20:1227-50). De forma similar, con la interacción con células MM, los osteoclastos y las células dendríticas producen BAFF y/o ligando inductor de la proliferación (APRIL) que proporciona señales anti-apoptóticas que también aumentan la resistencia a fármacos (De Raeve and Vanderkerken, 2005, Histol Histopathol. 20:1227-50; Kukreja et al., 2006, J Exp. Med. 203:1859-65).

Los principales eventos de la patogénesis del cáncer –proliferación incontrolada, supervivencia y propagación de células malignas – dependen de combinaciones concretas de tipos de células que lo propician y factores solubles presentes en nichos del microentorno. Los modelos de ratones desempeñan un papel importante en la caracterización de aspectos claves de las fuerzas de activación de la transformación maligna y la enfermedad en los seres humanos. Sin embargo, rara vez representan la complejidad genética y las características clínico-patogénicas de las enfermedades humanas. Aunque el uso de xenotrasplante de tumores humanos en ratones inmunocomprometidos está muy extendido, normalmente, el injerto con garantías es viable únicamente con tumores

o líneas celulares muy agresivas.

Los mejores modelos de los que se dispone actualmente para cultivar células de tumor humano son los ratones gravemente inmunodeficientes que carecen de linfocitos B, linfocitos T y células NK. En el caso de MM, el injerto de células de mieloma primarias en estos ratones no ha tenido éxito, pero es posible injertar células de mieloma primarias en piezas de hueso fetal humano tras el co-trasplante en ratones inmunocomprometidos (Yaccoby et al., 1998, Blood 92:2908-13). En este modelo, se encuentran las células MM en el hueso humano, pero no se detectan en hueso de ratón o en la periferia lo que demuestra un injerto muy residual y la necesidad del microentorno de la MO humana. (Yaccoby et al., 1998, Blood 92:2908-13; Yaccoby and Epstein, 1999, Blood 94:3576-82). Dado su potencial como modelo *in vivo* para MM, recientemente se ha demostrado que los ratones NOD/Scid/ $\gamma c^{-/-}$ admiten el injerto de varias líneas celulares MM (Dewan et al., 2004, Cancer Sci. 95:564-8; Miyakawa et al., 2004, Biochem Biophys Res Commun. 313:258-62). Sin embargo, incluso los modelos de ratón con un índice de rechazo a injerto bajo han restringido los entornos de crecimiento en virtud de un gran número de factores que no cruzan las barreras entre especies pero que son esenciales para dar soporte al crecimiento y la supervivencia de células transformadas (Manz, 2007). Los modelos *in vivo* que permitan sondear la compleja interacción patogénica entre el tumor y su entorno serán fundamentales para diseñar fármacos y terapias.

Por lo tanto, existe una necesidad aún no satisfecha de desarrollar métodos y animales métodos no humanos humanizados para cultivar de forma segura y estudiar células hematopoyéticas humanas, incluyendo células de tumor hematopoyéticas humanas primarias en ratones. La presente invención aborda estas necesidades aún no satisfechas en la técnica.

Sumario de la invención

Se proporcionan roedores genéticamente modificados que se pueden utilizar como modelos del desarrollo, el funcionamiento y la enfermedad de células hematopoyéticas humanas, función o enfermedad. Los roedores modificados genéticamente comprenden un ácido nucleico que codifica IL-6 humana unido operativamente a un promotor de IL-6 y expresan al menos uno entre M-CSF humano, IL-3 humano, GM-CSF humano, SIRPa humana o TPO humana. En algunos casos, el roedor genéticamente modificado es inmunodeficiente. En algunos de dichos casos, se injerta en el roedor células hematopoyéticas humanas sanas o enfermas. En el presente documento se divulgan métodos para utilizar los roedores genéticamente modificados objeto de la invención en la creación de modelos del desarrollo, función y/o enfermedad de células hematopoyéticas humanas, así como reactivos y kits de los mismos que encuentran uso en la obtención de los roedores genéticamente modificados objeto de la invención y/o la puesta en práctica de los métodos de la invención.

Los roedores genéticamente modificados no expresan la IL-6 nativa del roedor.

En algunas realizaciones, el roedor es un ratón. En algunas realizaciones, el promotor de IL-6 al que se une operativamente el ácido nucleico que codifica IL-6 humana es promotor IL-6 de ratón y el gen IL-6 humano se une operativamente al promotor de IL-6 de ratón en el locus de IL-6 de ratón.

El roedor genéticamente modificado comprende además uno o más ácidos nucleicos adicionales seleccionado entre un ácido nucleico que codifica SIRPa humana bajo el control de un promotor de SIRPa; un ácido nucleico que codifica MCSF humano unido operativamente a un promotor de M-CSF, en el que el roedor expresa M-CSF humano; un ácido nucleico que codifica IL-3 humana unida operativamente a un promotor de IL-3, en el que el roedor expresa IL-3 humana; un ácido nucleico que codifica GM-CSF humano unido operativamente a un promotor de GM-CSF, en el que el roedor expresa GM-CSF humano; y un ácido nucleico que codifica TPO humana unido operativamente a un promotor de TPO, en el que el roedor expresa TPO humano. En algunas realizaciones, el promotor es el promotor del gen humano. En otras realizaciones, el promotor es el promotor del gen de roedor. En algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado expresa la proteína nativa correspondiente del roedor. En otras realizaciones, el roedor genéticamente modificado no expresa la proteína nativa correspondiente del roedor.

En algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado es inmunodeficiente para el sistema inmune del roedor. En algunas de dichas realizaciones, el roedor genéticamente modificado inmunodeficiente no expresa un gen activador de la recombinación (RAG). En algunas de dichas realizaciones, el roedor genéticamente modificado inmunodeficiente no expresa la cadena gamma del receptor de IL-2 (IL2rg, o " γc "). En algunas de dichas realizaciones, el roedor genéticamente modificado inmunodeficiente no expresa RAG (p.ej. RAG1, RAG2) o IL2rg.

En algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado inmunodeficiente está injertado con células hematopoyéticas humanas para formar un roedor genéticamente modificado e injertado. En una realización, las células hematopoyéticas humanas se seleccionan entre células de sangre del cordón umbilical humanas, células de hígado fetal humanas y células de línea de células hematopoyéticas humanas. En una realización, las células hematopoyéticas humanas son células progenitoras CD34⁺. En una realización, las células hematopoyéticas humanas son células cancerosas. En ciertas realizaciones, las células cancerosas son células del mieloma múltiple humanas.

- 5 El roedor genéticamente modificado e injertado puede dar lugar a una célula humana seleccionada entre una célula CD34⁺, una célula madre hematopoyética, una célula hematopoyética, una célula precursora mieloide, una célula mieloide, una célula dendrítica, un monocito, un granulocito, un neutrófilo, un mastocito, un timocito, un linfocito T, un linfocito B, una célula plasmática, una plaqueta y una combinación de las mismas. La célula humana puede estar presente al mes, a los 2 meses, a 3 meses, a 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, o 12 meses del injerto.
- 10 El roedor genéticamente modificado e injertado puede dar lugar a un sistema hemato-linfoide humano que comprende células madre y progenitoras hematopoyéticas, células progenitoras mieloides humanas, células mieloides humanas, células dendríticas humanas, monocitos humanos, granulocitos humanos, neutrófilos humanos, mastocitos humanos, timocitos humanos, linfocitos T humanos, linfocitos B humanos, células plasmáticas humanas y plaquetas humanas. El sistema hemato-linfoide humano puede estar presente a los 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 12 meses del injerto.
- 15 En algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para generar un roedor injertado con células hematopoyéticas humanas. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para generar un modelo de roedor del desarrollo y función de células inmunes humanas. En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para generar un modelo de roedor del desarrollo y la función de linfocito B humano.
- 20 Los métodos comprenden trasplantar una población de células hematopoyéticas humanas a un roedor modificado genéticamente que es inmunodeficiente y que expresa un ácido nucleico que codifica IL-6 humana unida operativamente a un promotor de IL-6. El animal no expresa una IL-6 nativa funcional. En algunas realizaciones, el promotor de IL-6 es el promotor de IL-6 de roedor y el gen de IL-6 humano está unido operativamente al promotor de IL-6 del roedor en el locus de IL-6 del roedor. En algunas realizaciones, el roedor es un ratón. Siendo así, en algunas realizaciones, el promotor de IL-6 al que se une operativamente el ácido nucleico que codifica IL-6 humana es el promotor de IL-6 de ratón y el gen de IL-6 humana se une operativamente al promotor de IL-6 de ratón en el locus de IL-6 de ratón.
- 25 En algunas realizaciones, la población trasplantada de células hematopoyéticas comprende células CD34⁺. En algunas realizaciones, la población trasplantada de células hematopoyéticas comprende células cancerosas. En algunas realizaciones, la población trasplantada de células cancerosas comprende células de mieloma múltiple. En algunas realizaciones, el trasplante comprende inyección intrafemoral y/o intratibial.
- 30 En algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado inmunodeficiente expresa al menos un ácido nucleico humano adicional seleccionado del grupo que consiste en un ácido nucleico que codifica SIRPα humana unido operativamente a un promotor de SIRPα; un ácido nucleico que codifica M-CSF humano unido operativamente a un promotor de M-CSF; un ácido nucleico que codifica IL-3 humana unido operativamente a un promotor de IL-3; un ácido nucleico que codifica GM-CSF humano unido operativamente a un promotor de GM-CSF y un ácido nucleico que codifica TPO humana unido operativamente a un promotor de TPO.
- 35 En algunos aspectos de la invención, se proporcionan roedores genéticamente modificados injertados que expresan un ácido nucleico que codifica IL-6 humana unido operativamente a un promotor de IL-6, habiéndose preparado dichos roedores injertados de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento o tal como se conoce en la técnica. En algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado injertado es un modelo animal de desarrollo y diferenciación de linfocito B humano.
- 40 En varias realizaciones, se proporcionan métodos que abarcan el uso de los roedores genéticamente modificados injertados con células hematopoyéticas humanas de la presente divulgación. Estos métodos incluyen por ejemplo métodos para la evaluación *in vivo* del crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas e inmunes, métodos para la evaluación *in vivo* de hematopoyesis humana, métodos para la evaluación *in vivo* de células cancerosas, métodos para la evaluación *in vivo* de una respuesta inmune, métodos para la evaluación *in vivo* de vacunas y regímenes de vacunación, métodos para su uso para determinar el efecto de agentes que modulan el crecimiento o supervivencia de células cancerosas, métodos para la evaluación *in vivo* de un tratamiento de cáncer y métodos para la producción *in vivo* y recogida de mediadores inmunes, incluyendo anticuerpos humanos y para su uso en la determinación del efecto de agentes que modulan la función celular hematopoyética e inmune. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporcionan métodos para cribar un agente candidato en cuanto a su capacidad para tratar cáncer hematopoyético. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto a un roedor genéticamente modificado de la presente divulgación al que se han injertado células cancerosas hematopoyéticas humanas con un agente candidato y comparar la viabilidad y/o velocidad de proliferación de células cancerosas hematopoyéticas humanas en el roedor genéticamente modificado injertado que se ha puesto en contacto con las células cancerosas hematopoyéticas humanas en un roedor genéticamente modificado injertado de forma similar que no se ha puesto en contacto con el agente candidato, en el que una disminución de la viabilidad y/o velocidad de proliferación de las células cancerosas hematopoyéticas humanas en el roedor injertado que se ha puesto en contacto indica que el agente candidato sirve para tratar un cáncer hematopoyético. Éstos y otros métodos se pondrán de manifiesto para las personas especializadas en la técnica a partir de la divulgación del presente documento.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Breve descripción de los dibujos

La descripción detallada que se expone a continuación de las realizaciones preferentes de la invención se comprenderá mejor acompañando la lectura con los dibujos adjuntos. Debe subrayarse que, de acuerdo con la práctica habitual, los elementos de los dibujos no están a escala, sino que las dimensiones de los diferentes elementos están aumentadas o reducidas para mayor claridad. A fin de ilustrar la invención, en los dibujos se presentan las realizaciones preferentes. Debe advertirse sin embargo que la invención no queda limitada con las disposiciones e instrumentalizaciones de las realizaciones exactas que se presentan en los dibujos. En los dibujos se incluyen las siguientes figuras.

La Figura 1 es un conjunto de gráficos en los que se representan los resultados de los experimentos que demuestran el injerto de células INA-6 en ratones en los que se activa el gen IL-6 humano. Se miden los niveles de IL-6R soluble en los ratones de los genotipos indicados trasplantados con 5×10^6 células INA-6 por vía intravenosa. N indica el número de ratones trasplantados por grupo.

La Figura 2, que comprende la Figura 2A a la Figura 2F, es un conjunto de imágenes en las que se representan los análisis histológicos de fémures tras el injerto intravenoso de células INA-6. Se sacrificaron ratones Rag2^{-/-} Il2rg^{null} Il6^{h/h} hSIRPa⁺ a las ocho semanas del injerto con 5×10^6 células INA-6 por vía intravenosa. Se fijaron los fémures en 10 % formalina y se descalcificaron. Se tiñeron secciones de 10 μ M con azul de toluidina o se analizaron directamente en cuanto a la expresión de GFP utilizando un microscopio Leica Confocal.

La Figura 3 es un conjunto de imágenes de un gráfico en el que se representan los análisis de pulmones tras el injerto intravenoso de células INA-6. Se sacrificaron ratones Rag2^{-/-} Il2rg^{null} Il6^{h/h} hSIRPa⁺ a las ocho semanas del injerto con 5×10^6 células INA-6 inyectadas por vía intravenosa. Se fijó el tejido del pulmón en 10 % de formalina y se analizaron directamente secciones de 10 μ M en cuanto a la expresión de GFP utilizando un microscopio Leica Confocal. Las imágenes (izquierda) representan un aumento de las secciones de 10X (arriba) y 63X (abajo). El gráfico (derecha) representa la expresión del gen de IL-6 medido en los tejidos indicados y normalizados para la expresión de *hprt* murina.

La Figura 4 es un conjunto de gráficos en los que se representan los resultados de experimentos que demuestran el injerto de células INA-6 en ratones en los que se activa el gen IL-6 humano. Se midieron los niveles de IL-6R soluble en ratones de los genotipos indicados trasplantados con 5×10^5 células INA-6 por vía intrafemoral. Cada línea indica un ratón individual.

La Figura 5 es un conjunto de imágenes en las que se representa el análisis histológico de fémures tras el injerto intrafemoral de células INA-6. Se sacrificaron ratones Rag2^{-/-} Il2rg^{null} Il6^{h/h} hSIRPa⁺ a las cuatro a seis semanas del injerto con 5×10^5 células INA-6 inyectadas por vía intrafemoral. Se fijaron los fémures en 10 % de formalina y se descalcificaron. Se tiñeron secciones de 10 μ M con azul de toluidina.

La Figura 6 es un conjunto de imágenes y un gráfico en el que se representan los resultados del análisis μ CT de fémures murinos tras el trasplante de INA-6. Se sacrificaron ratones Rag2^{-/-} Il2rg^{null} Il6^{h/h} hSIRPa⁺ y de control a las cuatro semanas del injerto con 5×10^5 INA-6 inyectadas por vía intrafemoral. Se fijaron los fémures en 70 % de etanol y se analizaron utilizando μ CT murino. Se cuantificaron los volúmenes del tejido y el hueso trabecular para calcular la relación entre el volumen del hueso y el tejido. *: $p < 0,01$ según la prueba T de Student.

La Figura 7 es un gráfico en el que se representan los resultados del análisis μ CT de fémures murinos tras el tratamiento con fármacos anti-mieloma. Se injertaron ratones Rag2^{-/-} Il2rg^{null} Il6^{h/h} hSIRPa⁺ con 5×10^5 células INA-6 por inyección intrafemoral y se trataron dos veces a la semana con Velcade® o Zometa®, respectivamente. Al cabo de cuatro semanas, se sacrificó a los ratones y se fijaron los fémures en 70 % de etanol para el análisis μ CT. Se cuantificaron los volúmenes de tejido y de hueso trabecular para calcular la relación entre el volumen del hueso y del tejido.

La Figura 8 es un conjunto de gráficos en los que se representan los resultados del análisis FACS de injerto de células primarias en ratones Rag2^{-/-} Il2rg^{null} hSIRPa⁺ Tpo^{h/h} Mcsf^{h/h} Il3/Gmcsf^{h/h} Il6^{h/h}. Se trasplantó a los ratones con $1,5 \times 10^6$ de células de médula ósea con empobrecimiento de CD3 inyectadas por vía intrafemoral y se sacrificaron doce semanas más tarde. Se generaron las suspensiones de célula simple del fémur inyectado, la pierna colateral y al bazo. Se tiñeron las células para mCD45, hCD19, hCD38 y hCD138. Los gráficos FACS presentan los eventos después del gatillado en células mCD45 negativas. Los números indican la frecuencia de células CD38+CD138+.

La Figura 9 representa los resultados de experimentos en los que se evalúa el porcentaje de células (hCD45+) hematopoyéticas humanas en la sangre de un ratón injertado determinado por citometría de flujo. Las barras horizontales indican las frecuencias medias correspondientes.

La Figura 10 representa los resultados de experimentos en los que se evalúa el porcentaje de hCD45 de linfocitos B (CD 19+), T (CD3+) y células mieloides (CD33+) en la sangre de ratones injertados por citometría de flujo. Solamente se muestran los ratones con un porcentaje de hCD45 superior a 2 %.

La Figura 11, que comprende las Figuras 11A y 11B, representa los resultados de experimentos en los que se evalúa el porcentaje (A) y el número (B) de células CD45+ humanas en MO, bazo y timo de ratones injertados de 20 semanas. Las barras representan el promedio \pm SEM de 4/5 ratones por grupo.

La Figura 12, que comprende las Figuras 12A y 12B, representa los resultados de los experimentos FACS que evalúan células humanas. (A) Dibujo que muestra la estrategia de gatillado utilizada para separar diferentes poblaciones de linfocitos B por citometría de flujo. (B) Porcentaje de diferentes subgrupos de linfocitos B dentro de células CD45+CD19+ humanas en ratones de 20 semanas de vida. Las barras representan el promedio \pm SEM de 4/5 ratones por grupo.

La Figura 13, que comprende las Figuras 13A y 13B, representa los resultados de los experimentos FACS que evalúan células humanas. (A) Análisis de citometría de flujo representativo de linfocitos B CD5+ en hígado fetal humano (HF) y ratones de 20 semanas. Los números en los cuadrantes indican los porcentajes de células. Se trazan en todos los gráficos células CD45+. (B). Porcentaje de CD5 en linfocitos B humanos en MO y bazo de ratones injertados de 20 semanas. Las barras representan la media \pm SEM de 4/% ratones por grupo.

La Figura 14 representa los resultados de los experimentos FACS que evalúan células humanas. (A) Análisis de citometría de flujo representativo de linfocitos B CD27+ en hígado fetal humano (HF) y ratones de 20 semanas. Los números en los cuadrantes indican los porcentajes de células. Se trazan en todos los gráficos células CD45+. (B). Porcentaje de CD27 en linfocitos B humanos en MO y bazo de ratones injertados de 20 semanas. Las barras representan la media \pm SEM de 4/% ratones por grupo.

La Figura 15 representa los resultados de experimentos en los que se evalúa los niveles totales de IgM e IgG en muestras de plasma de ratones de 12 (A) y 20 (B) semanas de vida. Las barras horizontales indican las medias geométricas correspondientes. Los ratones con injerto humano de sangre periférica inferior a 2 % fueron excluidos de los experimentos.

Descripción detallada

Se proporcionan roedores genéticamente modificados que se pueden utilizar para un modelo del desarrollo, función o enfermedad de célula hematopoyética humana. Los roedores genéticamente modificados comprenden un ácido nucleico que codifica IL-6 humana unido operativamente a un promotor de IL-6 y también expresan al menos uno entre M-CSF humano, IL-3 humana, GM-CSF humano, SIRP α humana o TPO humana. La invención se refiere asimismo a métodos de generación y métodos de uso de los roedores genéticamente modificados descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado es un ratón. En algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado descrito en el presente documento está injertado con células hematopoyéticas humanas, incluyendo células normales o neoplásicas o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado descrito en el presente documento está injertado con células de mieloma múltiple (MM) humanas. En varias realizaciones, los roedores genéticamente modificados injertados con la célula hematopoyética humana de la invención son útiles para la evaluación *in vivo* del crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas e inmunes, para la evaluación *in vivo* de hematopoyesis humana, para la evaluación *in vivo* de células cancerosas, para la evaluación *in vivo* de una respuesta inmune, para la evaluación *in vivo* de vacunas y regímenes de vacunación, para el uso en la determinación por ensayo del efecto de agentes que modulan el crecimiento o supervivencia de células cancerosas, para la evaluación *in vivo* de un tratamiento de cáncer para la producción *in vivo* y la recogida de mediadores inmunes, incluyendo anticuerpos humanos y para su uso en la determinación por ensayo del efecto de agentes que modulan la función celular hematopoyética y celular.

Estos y otros objetos, ventajas y características de la invención se pondrán de manifiesto para las personas especializadas en la técnica con la lectura de los detalles de las composiciones y los métodos que se describen a continuación más detalladamente.

Definiciones

A no ser que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden habitualmente las personas especializadas en la técnica en la que se enmarca la presente invención. Dichos términos se encuentran definidos y se utilizan en el contexto en varias referencias convencionales, entre las que se incluyen a modo ilustrativo J. Sambrook and D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 4^a Ed., 2012; F. M. Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5^a Ed., 2002; B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4^a Ed., Garland, 2002; D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4^a Ed., W.H. Freeman & Company, 2004; y Herdewijn, P. (Ed.), *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, *Methods in Molecular Biology*, Human Press, 2004. Si bien es posible utilizar cualquier método o material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la puesta en práctica o ensayo de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferentes.

Tal como se utiliza en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado que se le asocia en la presente sección.

Los artículos "un" "una" se utilizan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) de los sustantivos que acompañan al artículo gramatical. A modo de ejemplo "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Se pretende que "Aproximadamente" tal como se utiliza en el presente documento, cuando se refiere a un valor que se puede calibrar como pueda ser una cantidad, una duración temporal y similar, abarque las variaciones de ± 20 % o ± 10 %, más preferentemente ± 5 %, incluso más preferentemente ± 1 % y aún más preferentemente $\pm 0,1$ % del valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados.

El término "anormal" cuando se utiliza en el contexto de organismos, tejidos, células o componentes de los mismos,

5 incluye los organismos, tejidos, células o componentes de los mismos que difieren en al menos una característica observable o detectable (p.ej., edad, tratamiento, momento del día, etc.) de los organismos, tejidos, células o componentes de los mismos que presentan la característica "normal" (esperada) correspondiente. Las características que son normales o esperadas para un tipo de célula o tejido podrían ser anormales para un tipo de célula o tejido diferente.

10 El término "anticuerpo," tal como se utiliza en el presente documento, incluye una molécula de inmunoglobulina que es capaz de unirse a un epitopo específico sobre un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmuno-reactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos en la presente invención pueden existir en diversas formas, incluyendo por ejemplo anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos intracelulares ("intracuerpos"), Fv, Fab y F(ab)2, así como anticuerpos monocatenarios (scFv), anticuerpos de cadena pesada, como anticuerpos de camélidos y anticuerpos humanizados (Harlow et al., 1999, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).

20 Expresión "constitutivo" incluye un estado en el que se produce un producto génico en una célula viva en todas o la mayoría de las condiciones fisiológicas de la célula.

25 Una "región de codificación" de un gen incluye los restos de nucleótidos de la cadena codificante del gen y los nucleótidos de la cadena no codificante del gen que son homólogos o complementarios, respectivamente a la región de codificación de una molécula de ARNm que se produce por transcripción del gen. Una "región de codificación" de una molécula de ARNm también incluye los restos de nucleótidos de la molécula de ARNm que están apareados con una región anti-codón de una molécula de ARN de transferencia durante la traducción de la molécula del ARNm o que codifica un codón de parada. La región de codificación puede incluir por tanto restos de nucleótidos que comprenden condones para los restos de aminoácidos que no están presentes en la proteína madura codificada por la molécula de ARNm (p.ej., restos de aminoácidos en una secuencia de señal de exportación de proteína).

30 Una "enfermedad" incluye un estado de salud de un animal en el que el animal no puede mantener la homeostasia y en el que si no mejora la enfermedad continúa deteriorándose la salud del animal.

35 En contraposición, un "trastorno" en un animal incluye un estado de salud en el que el animal puede mantener la homeostasia pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable del que lo sería en ausencia del trastorno. Dejar sin tratar un trastorno no causa necesariamente una mayor disminución del estado de salud del animal.

40 Una enfermedad o trastorno se "alivia" cuando se reduce la gravedad de un síntoma de la enfermedad o trastorno o la frecuencia con la que el paciente experimenta dichos síntomas o ambos.

45 Una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto incluye la cantidad de compuesto que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso en el paciente al que se le administra el compuesto. Una "cantidad eficaz" de un vehículo de administración incluye la cantidad suficiente para unirse o administrar eficazmente un compuesto.

50 "Codificar" incluye la propiedad inherente de secuencias de nucleótidos específicos en un polinucleótido, como por ejemplo un gen, un ADNc, o un ARN, para servir como matrices para la síntesis de otros polímeros o macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia de nucleótidos definida (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia de aminoácidos definida y las propiedades biológicas que resultan de ella. Por lo tanto, un gen codifica una proteína si, por ejemplo, la transcripción y traducción del ARNm que corresponde a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Se puede hacer referencia tanto a la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y se proporciona normalmente en el listado de frecuencias, como a la cadena no codificante, utilizada como matriz para la transcripción de un gen o ADNc, como codificantes de la proteína u otro producto del gen o ADNc.

55 Tal como se utiliza en el presente documento "endógeno" incluye cualquier material de un organismo, célula, tejido o sistema, o que se produce dentro de ellos

60 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "exógeno" incluye cualquier material introducido o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

65 Los términos "construcción de expresión" y "casete de expresión" tal como se utilizan en el presente documento incluyen una molécula de ADN recombinante bicatenaria que contiene la secuencia que codifica un ácido nucleico humano deseado y que contiene uno o más elementos reguladores necesarios o deseables para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente.

- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fragmento," aplicado a un ácido nucleico o polipéptido incluye una subsecuencia de un ácido nucleico o polipéptido mayor. Un "fragmento" de un ácido nucleico puede ser de al menos aproximadamente 15 nucleótidos de longitud; por ejemplo, de al menos aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos; de al menos aproximadamente 100 a aproximadamente 500 nucleótidos, de al menos aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 nucleótidos, de al menos aproximadamente 1000 nucleótidos a aproximadamente 1500 nucleótidos; o de aproximadamente 1500 nucleótidos a aproximadamente 2500 nucleótidos; o de aproximadamente 2500 nucleótidos (y cualquier valor de número entero intermedio). Un "fragmento" de un polipéptido puede ser de al menos aproximadamente 15 nucleótidos de longitud; por ejemplo, de al menos aproximadamente 50 aminoácidos a aproximadamente 100 aminoácidos; de al menos aproximadamente 100 a aproximadamente 500 aminoácidos, de al menos aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 aminoácidos, de al menos aproximadamente 1000 aminoácidos a aproximadamente 1500 aminoácidos; o de aproximadamente 1500 aminoácidos a aproximadamente 2500 aminoácidos; o aproximadamente 2500 aminoácidos (y cualquier valor de número entero intermedio).
- 15 Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "gen" y "gen recombinante" incluyen moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido. Dichas variaciones alélicas naturales pueden tener como resultado normalmente 1-5 % de varianza de la secuencia de nucleótidos de un gen determinado. Se pueden identificar alelos alternativos secuenciando el gen de interés en una serie de individuos diferentes. Esto puede llevarse a cabo fácilmente utilizando sondas de hibridación para identificar el mismo locus genético de varios individuos. Se pretende que cualquier y todas estas variaciones de nucleótidos y los polimorfismos o variaciones de aminoácido resultantes que son el resultado de variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional entren dentro del alcance de la invención.
- 20 "Homólogo" tal como se utiliza en el presente documento, incluye la similitud de secuencia de subunidad entre dos moléculas poliméricas, p.ej., entre dos moléculas de ácido nucleico, p.ej., dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN o entre dos moléculas de polipéptido. Cuando está ocupada una posición de la subunidad en ambas moléculas por la misma subunidad monomérica, p.ej., si está ocupada una posición en cada una de las dos moléculas de ADN por adenina, entonces, son homólogas en dicha posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de apareamientos o posiciones homólogas, p.ej., si son homólogas la mitad (p.ej., cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias compuestas entonces las dos secuencias son 50 % homólogas, si 90 % de las posiciones, por ejemplo 9 de las 10 están apareadas o son homólogas, las dos secuencias comparten un 90 % de homología. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN 5'-ATTGCC-3' y 5'-TATGGC-3' comparten un 50 % de homología.
- 25 Las expresiones "células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas" y "HSPC humanas", tal como se utiliza en el presente documento, incluyen células madre hematopoyéticas multipotentes de auto-renovación humanas y células progenitoras hematopoyéticas.
- 30 Expresión "Inducible" incluye un estado en el que se obtiene un producto génico en una célula viva como respuesta a la presencia de una señal en la célula.
- 35 Tal como se utiliza en el presente documento, un "material con instrucciones" incluye una publicación, un registro, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que se puede utilizar para comunicar la utilidad de un compuesto, composición, vector o sistema de administración de la invención en el kit para llevar a efecto el alivio de las distintas enfermedades o trastornos que se han citado. Opcionalmente, o alternativamente, el material con instrucciones puede describir uno o más métodos para aliviar la enfermedad o trastorno en una célula o un tejido de un mamífero. El material de instrucciones del kit de la invención puede fijarse al envase que contiene el compuesto, composición, vector o sistema de administración de la invención identificado o puede suministrarse en combinación con el envase que contiene el compuesto, composición, vector o sistema de administración identificado. Alternativamente, el material con instrucciones puede suministrarse por separado del envase con el fin de que el receptor pueda utilizar conjuntamente el material de instrucciones y el compuesto.
- 40 El término "ácido nucleico" incluye moléculas de ARN o ADN que tienen más de un nucleótido en cualquier forma incluyendo monocatenario, bicatenario, oligonucleótido o polinucleótido. El término "secuencia de nucleótidos" incluye el ordenamiento de nucleótidos en un oligonucleótido o polinucleótido en una forma monocatenaria de ácido nucleico.
- 45 El término "operativamente unido" tal como se utiliza en el presente documento incluye un polinucleótido en relación funcional con un segundo polinucleótido, p.ej. una fracción de ácido nucleico monocatenaria o bicatenaria que comprende los dos polinucleótidos dispuestos dentro de la fracción de ácido nucleico de manera que al menos uno de los dos polinucleótidos es capaz de ejercer un efecto fisiológico por el que se caracteriza al otro. A modo de ejemplo, un promotor unido operativamente a la región de codificación de un gen es capaz de promover la transcripción de la región de codificación. Preferentemente, cuando el ácido nucleico que codifica la proteína deseada comprende además un promotor/secuencia reguladora, el promotor/ secuencia reguladora se ubica en el extremo 5' de la secuencia que codifica la proteína deseada de manera que activa la expresión de la proteína deseada en la célula. En combinación, el ácido nucleico que codifica la proteína deseada y su promotor/ secuencia
- 50
- 55
- 60
- 65

reguladora comprende un "transgen."

El término "polinucleótido" tal como se utiliza en el presente documento incluye una cadena de nucleótidos. Asimismo los, ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por tanto, los ácidos nucleicos y polinucleótidos tal como se utilizan en el presente documento son intercambiables. Las personas especializadas en la técnica cuentan con el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que se pueden hidrolizar en "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos monoméricos se pueden hidrolizar en nucleósidos. Tal como se utilizan en el presente documento, polinucleótidos incluyen, pero sin limitarse a ellos, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen a través de cualquiera de los medios disponibles en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico desde una genoteca recombinante o un genoma de la célula utilizando la tecnología de clonación habitual y PCR y similares, o a través de otro medio de síntesis.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "péptido," "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente e incluyen un compuesto que comprende restos de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces péptido. Una proteína o un péptido deben contener al menos dos aminoácidos y no se establecen limitaciones en cuanto al número máximo de aminoácidos que pueden componer una secuencia de proteína o péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces péptido. Tal como se utiliza en el presente documento, el término incluye tanto cadenas cortas, que en la técnica se denominan también habitualmente péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, como cadenas más largas de las que existen muchos tipos. "Polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros y variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o una combinación de los mismos. El término "péptido" se refiere normalmente a polipéptidos cortos. El término "proteína" se refiere normalmente a polipéptidos largos.

El término "progenie" tal como se utiliza en el presente documento incluye un descendiente o vástago e incluye los descendientes diferenciados o no diferenciados de un progenitor. En un uso, el término progenie incluye un descendiente que es genéticamente idéntico al progenitor. En otro uso, el término progenie incluye un descendiente que es genéticamente y fenotípicamente idéntico al progenitor. En otro uso más, el término progenie incluye un descendiente que se ha diferenciado del progenitor.

El término "promotor" tal como se utiliza en el presente documento incluye una secuencia de ADN unida operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos que se va a transcribir como, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una molécula deseada. Un promotor se ubica generalmente en dirección 5' de una secuencia de ácidos nucleicos que se va a transcribir y proporciona un sitio para unión específica mediante ARN polimerasa y otros factores de transcripción. En realizaciones específicas, generalmente, se ubica un promotor en dirección 5' de la secuencia de aminoácidos transcrita para producir la molécula deseada y proporciona un sitio para la unión específica mediante ARN polimerasa y otros factores de transcripción.

Intervalos: A lo largo de la presente divulgación, se pueden presentar diversos aspectos de la invención en formato intervalo. Debe entenderse que la descripción de un formato intervalo es simplemente para mayor brevedad y comodidad y no deberá considerarse como una limitación rigurosa del alcance de la invención. Por consiguiente, deberá considerarse que la descripción de un intervalo incluye específicamente todos los posibles sub-intervalos y los valores numéricos individuales dentro del intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo como por ejemplo de 1 a 6, deberá considerarse como la divulgación específica de subintervalos como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 de 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como los números individuales dentro del intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto se aplica sea cual sea la extensión del intervalo.

Un "polipéptido recombinante" incluye cualquiera que se produzca tras la expresión de un polinucleótido recombinante.

El término "elemento regulador" tal como se utiliza en el presente documento incluye una secuencia de nucleótidos que controla algún aspecto de la expresión de las secuencias de ácido nucleico. Entre los ejemplos de elementos reguladores se incluyen un potenciador, un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES), un intrón, un origen de replicación, una señal de poliadenilación (pA), un promotor, un potenciador, una secuencia de terminación de la transcripción y un dominio regulador en dirección 5', que contribuye a la replicación, la transcripción o el proceso post-transcripcional de una secuencia de ácidos nucleicos. Las personas especializadas en la técnica serán capaces de seleccionar y utilizar éstos y otros elementos reguladores en una construcción de expresión sin mayor experimentación de rutina. Las construcciones de expresión se pueden generar por recombinación o sintéticamente aplicando la metodología conocida.

El término "se une específicamente", tal como se utiliza en el presente documento en relación con un anticuerpo, incluye un anticuerpo que reconoce un antígeno específico, pero que no reconoce o se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno desde una especie se puede unir también a ese antígeno de una o más especies. Pero, dicha reactividad cruzada entre

distintas especies no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. Según otro ejemplo más, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno también se puede unir a diferentes formas alélicas del antígeno. Sin embargo, dicha reactividad cruzada no altera en sí la clasificación del anticuerpo como específico.

- 5 En algunos casos, las expresiones “que se une específicamente” o “de unión específica” se pueden utilizar en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, para significar que la interacción depende de la presencia de una estructura en particular (p.ej., un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína específica, en lugar de las proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítipo “A”, la presencia de una molécula que contiene epítipo A (o libre, A sin marcar), en una reacción que contiene “A” marcado y el anticuerpo reducirá la cantidad de A marcada unida al anticuerpo.

15 El término “anticuerpo sintético”, tal como se utiliza en el presente documento incluye un anticuerpo que se genera utilizando tecnología de ADN recombinante, de manera que, por ejemplo, se expresa un anticuerpo mediante un bacteriófago, tal como se describe en el presente documento. Asimismo, se deberá interpretar el significado del término como un anticuerpo que ha sido generado por síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y que dicha molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en el que el ADN o la secuencia de aminoácidos se han obtenido utilizando tecnología de secuencias de aminoácidos o ADN sintéticos que está disponible y es muy conocida en la técnica.

20 “Variante”, tal como se utiliza el término en el presente documento incluye una secuencia de ácidos nucleicos o una secuencia de péptidos que difiere en la secuencia con respecto a la secuencia del ácido nucleico de referencia o la secuencia de péptidos, respectivamente, pero que retiene las propiedades biológicas esenciales de la molécula de referencia. Es posible que los cambios en la secuencia de una variante de ácido nucleico no alteren la secuencia de aminoácidos de un péptido codificado por el ácido nucleico de referencia, o que resulten en sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos del aminoácido. Los cambios en la secuencia de las variantes de péptido normalmente están limitadas o son conservadoras, de manera que las secuencias del péptido de referencia y la variante son muy similares globalmente y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y un péptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, adiciones, deleciones en cualquier combinación. Una variante de un ácido nucleico o péptido puede tener lugar de forma natural, como por ejemplo una variante alélica, o puede ser una variante que, según se sabe, es de origen natural. Las variantes que no son de origen natural de los ácidos nucleicos y péptidos pueden obtenerse por técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.

35 El término “modificado genéticamente” incluye un animal, cuyas células germinales comprenden un ácido nucleico humano exógeno o una secuencia de ácidos nucleicos humana. A modo de ejemplos no exhaustivos, un animal modificado genéticamente puede ser un animal transgénico o un animal en el que se ha activado un gen, siempre y cuando el animal comprenda una secuencia de ácidos nucleicos humana.

40 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “animal transgénico” incluye un animal que comprende una secuencia de ácidos nucleicos humana exógena integrada en el genoma del animal.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, “gen activado” o “activación de gen” o “con gen activado” incluye una modificación genética que va dirigida a un locus cromosómico en particular del genoma animal no humano e inserta un ácido nucleico de interés en dicho locus dirigido. En algunos casos, la modificación genética reemplaza la información genética codificada en el locus cromosómico en el animal no humano con una secuencia de ADN diferente.

Animales no humanos modificados genéticamente

50 En algunos aspectos de la invención, se proporciona un roedor genéticamente modificado que expresa IL-6 humana. Se entiende por IL-6 humana (hIL6) la proteína de 184 aminoácidos cuya secuencia se describe p.ej. en Genbank Nos. de acceso NM_000600.3 y NP_000591.1. La IL-6 humana es una proteína secretada producida por ejemplo, por Linfocitos T, Linfocitos B, monocitos, macrófagos, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y células de mieloma. IL-6 actúa a través de un complejo de receptor heterodimérico de la superficie de la célula que comprende una subunidad de unión (IL-6R) y una subunidad de transducción de señal (gp 130). gp 130 es un componente común de otros receptores, como los de IL-11, IL-27, LIF, mientras que IL-6R se restringe predominantemente a hepatocitos, monocitos, Linfocitos B activados, Linfocitos T en reposo y líneas celulares de mieloma. IL-6 desempeña un papel central en la hematopoyesis, en respuestas inmunes y en reacciones en fase aguda, habiéndose demostrado que es un importante factor para la maduración final de linfocitos B en linfocitos secretores de anticuerpos (ASC), especialmente para la expansión de plasmablastos durante la reacción del centro germinal en la respuesta de anticuerpo T-dependiente (TD). IL-6 es necesaria para la proliferación de linfocitos T *in vitro* y para la generación de linfocitos T citotóxicos (CTL) *in vivo*, haciéndolos más sensibles a IL-2.

65 El roedor genéticamente modificado que expresa IL-6 humana también expresa al menos una proteína humana adicional seleccionada entre M-CSF humano, IL-3 humana, GM-CSF humano, TPO humana y SIRPa humana o

cualquier combinación de los mismos. Es decir, el roedor que expresa IL-6 humana puede expresar una, dos, tres, cuatro o cinco proteínas humanas seleccionadas entre hM-CSF, hIL-3, hGM-CSF, hTPO y hSIRPa. Los roedores genéticamente modificados que expresan hM-CSF, hIL-3, hGM-CSF, hTPO, y/o hSIRPa en los que se pueden diseñar los roedores objeto de la invención o a partir de los cuales se pueden generar los roedores objeto de la invención son muy conocidos en la técnica y se explican con mayor detalle, por ejemplo, en la solicitud estadounidense No. US 2013/0042330 y en Rathinam et al. 2011, Blood 118:3119-28, que divulga ratones en los que se activa un gen que expresa M-CSF humano; la patente estadounidense No. 8.541.646 y Willinger et al. 2011, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos, 108:2390-2395, que divulgan ratones en los que se activa un gen que expresa IL-3 humana y GM-CSF humano; la patente estadounidense No. 8.541.646 y Rongvaux et al. 2011, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos, 108:2378-83, que divulga ratones en los que se activa un gen que expresa TPO humana; y la solicitud PCT No. WO 2012/040207 y Strowig et al. 2011, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos 108(32):13218-13223, que divulga ratones transgénicos que expresan SIRPa humana.

En varias realizaciones, el ácido nucleico que codifica la proteína humana está unido operativamente a una o más secuencias reguladoras de manera que permite la transcripción del ácido nucleico en ARNm y la traducción del ARNm en la proteína humana. El término "secuencia reguladora" se acepta en la técnica y se pretende que incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (p.ej. señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras son conocidas entre las personas especializadas en la técnica y se describen en 1990, Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. En una realización, el ácido nucleico humano es expresado por elemento reguladores nativos del ácido nucleico humano. En otra realización, el ácido nucleico humano es expresado por los elementos reguladores nativos del ácido nucleico del animal huésped roedor correspondiente.

Por tanto, en algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica IL-6 humana está unido operativamente al promotor de IL-6 del roedor. En otras realizaciones, el ácido nucleico que codifica IL-6 humana está unido operativamente en el promotor de IL-6 humana. Según un ejemplo más, en algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica M-CSF humano está unido operativamente al promotor de M-CSF del roedor. En otras realizaciones, el ácido nucleico que codifica M-CSF humano está unido operativamente al promotor de M-CSF humano. Según un tercer ejemplo, en algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica IL-3 humana está unido operativamente al promotor de IL-3 de roedor. En otras realizaciones, el ácido nucleico que codifica IL-3 humana está unido operativamente al promotor de IL-3 humana. Según un cuarto ejemplo, en algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica GM-CSF humano está unido operativamente al promotor de GM-CSF del roedor. En otras realizaciones, el ácido nucleico que codifica GM-CSF humano está unido operativamente al promotor de GM-CSF humano. Según un quinto ejemplo, en algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica TPO humana está unido operativamente al promotor de TPO del roedor. En otras realizaciones, el ácido nucleico que codifica TPO humana está unido operativamente al promotor de TPO humana.

Las personas especializadas en la técnica entenderán que los roedores genéticamente modificados de la invención incluyen roedores genéticamente modificados que expresan al menos un ácido nucleico humano desde un promotor. Entre los ejemplos no exhaustivos de promotores que se expresan ubicuamente útiles en la invención se incluyen, pero sin limitarse a ellos, promotor ADN pol II, promotor de PGK, promotor de ubiquitina, promotor de albúmina, promotor de globina, promotor de ovalbúmina, promotor de SV40 temprano, promotor de virus sarcoma de Rous (RSV), LTR retroviral y LTR lentiviral, un promotor de beta-actina, un promotor de ROSA26, un promotor de proteína de choque térmico 70 (Hsp70), un promotor de gen EF-1 alfa que codifica factor de elongación 1 alfa (EF1), un promotor del factor de iniciación eucariota 4A (eIF-4A1), un promotor cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) y un promotor de CMV (citomegalovirus). Los sistemas de expresión de promotor y potenciador útiles en la invención incluyen también sistemas de expresión específicos de tejido y/o inducibles. Entre los ejemplos no exhaustivos de promotores específicos de tejido útiles en la construcción de expresión de las composiciones y métodos de la invención se incluyen un promotor de un gen expresado en el sistema hematopoyético, como por ejemplo, un promotor de IL-6, un promotor de M-CSF, un promotor de IL-3, un promotor de GM-CSF, un promotor de SIRPa, un promotor de TPO, un promotor de IFN- β , un promotor de proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP), un promotor de CD45 (denominado también antígeno común de leucocitos), un promotor de Flt-1, un promotor de endoglin (CD105) y un promotor de ICAM-2 (Molécula de adhesión intracelular 2). Éstos y otros promotores útiles en las composiciones y métodos de la invención son conocidos en la técnica y se ilustran en Abboud et al. (2003, J. Histochem & Cytochem. 51:941-949), Schorpp et al. (1996, NAR 24:1787-1788), McBurney et al. (1994, Devel. Dynamics, 200:278-293) and Majumder et al. (1996, Blood 87:3203-3211). Además de comprender un promotor, en varias realizaciones de la invención, se incluyen uno o más elementos reguladores adicionales, como, por ejemplo, un elemento potenciador o una secuencia intrónica. Entre los ejemplos de potenciadores útiles en las composiciones y métodos de la invención se incluyen, pero sin limitarse a ellos, un elemento potenciador de citomegalovirus (CMV) temprano y un elemento potenciador de SV40. Entre los ejemplos de secuencias intrónicas útiles en las composiciones y métodos de la invención se incluyen, pero sin limitarse a ellos, el intrón beta globina o un intrón genérico. Otros elementos reguladores adicionales útiles en algunas realizaciones de la invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, una secuencia de terminación de la transcripción y una secuencia de poliadenilación (pA) de ARNm.

Las personas especializadas en la técnica podrán apreciar asimismo que la adición de secuencias de ácido nucleico

y aminoácidos humanas de origen natural, en lo que se refiere al ácido nucleico humano o aminoácido humano, abarcan variantes de las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanas también. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "variante" define o bien un mutante genético de origen natural aislado de un humano o bien una variación preparada por recombinación de un humano, conteniendo cada una de ellas una o más mutaciones en comparación con la humana de tipo silvestre correspondiente. Por ejemplo, dichas mutaciones pueden tener una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos. El término "variante" incluye también ortólogos no humanos. En algunas realizaciones, una variante de polipéptido de la presente invención tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con un polipéptido humano de tipo silvestre.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias se determina empleando técnicas como las descritas a lo largo del presente documento. Se pueden introducir mutaciones utilizando técnicas de biología molecular normales, como mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las personas especializadas en la técnica reconocerán que es posible introducir una o más mutaciones de aminoácido sin alterar las propiedades funcionales de las proteínas humanas.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácido conservadoras en proteínas humanas para producir variantes de proteínas humanas. Las sustituciones de aminoácido conservadoras son sustituciones de un aminoácido por otro aminoácido que tiene características similares, aceptadas en la técnica. Por ejemplo, se puede describir cada aminoácido por tener una o más de las siguientes características: electropositiva, electronegativa, alifática, aromática, polar, hidrófoba e hidrófila. Una sustitución conservadora es una sustitución de un aminoácido que tiene una característica estructural o funcional por otro aminoácido que tiene la misma característica. Entre los aminoácidos ácidos se incluyen aspartato, glutamato; entre los aminoácidos básicos se incluyen histidina, lisina, arginina; entre los aminoácidos alifáticos se incluyen isoleucina, leucina y valina; entre los aminoácidos aromáticos se incluyen fenilalanina, glicina, tirosina y triptofano; entre los aminoácidos polares se incluyen aspartato, glutamato, histidina, lisina, asparagina, glutamina, arginina, serina, treonina y tirosina; y entre los aminoácidos hidrófobos se incluyen alanina, cisteína, fenilalanina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, valina y triptofano; y las sustituciones conservadoras incluyen sustituciones entre los aminoácidos dentro de cada grupo. Se pueden describir los aminoácidos también en lo que se refiere al tamaño relativo, alanina, cisteína, aspartato, glicina, asparagina, prolina, treonina, serina, valina se consideran normalmente como pequeños.

Las variantes humanas pueden incluir análogos de aminoácidos sintéticos, derivados de aminoácido y/o aminoácidos no convencionales, entre los que se incluyen a modo ilustrativo y sin limitación, ácido alfa-aminobutírico, citrulina, canavanina, cianoalanina, ácido diaminobutírico, ácido diaminopimélico, ácido dihidroxifenilalanina, ácido djencólico, homoarginina, hidroxiprolina, norleucina, norvalina, 3-fosfoserina, homoserina, 5-hidroxitriptofano, 1-metilhistidina, metilhistidina y ornitina.

Las variantes humanas están codificadas por ácidos nucleicos que tienen un alto grado de identidad con un ácido nucleico que codifica uno humano de tipo silvestre. El complemento de un ácido nucleico que codifica una variante humana se hibrida específicamente con un ácido nucleico que codifica uno humano de tipo silvestre en condiciones muy rigurosas. Los ácidos nucleicos que codifican una variante humana se pueden aislar o generar por recombinación o síntesis aplicando una metodología perfectamente conocida.

En algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado que expresa una secuencia de ácidos nucleicos humana también expresa la correspondiente secuencia de ácidos nucleicos animal no-humana. Por ejemplo, y tal como se describe con mayor detalle más adelante, en ciertas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos está integrada aleatoriamente en el genoma del roedor, p.ej., para que el roedor comprenda la secuencia de ácidos nucleicos humana exógena en un locus distinto al del locus del roedor que codifica la correspondiente proteína del roedor. En otras realizaciones, el roedor genéticamente modificado que expresa una secuencia de ácidos nucleicos humana no expresa la correspondiente secuencia de ácidos nucleicos del roedor. Por ejemplo, y tal como se describe con mayor detalle más adelante, en ciertas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la proteína humana se introduce en el roedor para reemplazar el material genómico que codifica la correspondiente proteína del roedor, inactivando en el roedor el correspondiente gen del roedor y haciendo que el roedor sea deficiente en la correspondiente proteína. Es decir, se activa el gen humano en el roedor.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado que expresa IL-6 humana también expresa IL-6 de roedor. En otras realizaciones, el roedor genéticamente modificado que expresa IL-6 humana no expresa IL-6 del roedor. Según un segundo ejemplo, en algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado que expresa M-CSF humano también expresa M-CSF de roedor. En otras realizaciones, el roedor genéticamente modificado que expresa M-CSF humano no expresa M-CSF de roedor. Según un tercer ejemplo, en algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado que expresa IL-3 humana también expresa IL-3 de roedor. En otras realizaciones, el roedor genéticamente modificado que expresa IL-3 humana no expresa IL-3 de roedor. Según un cuarto ejemplo, en algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado que expresa GM-CSF humano también expresa GM-CSF de roedor. En otras realizaciones, el roedor genéticamente modificado que expresa GM-CSF humano no expresa GM-CSF de roedor. Según un quinto ejemplo, en algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado que expresa TPO humana también expresa TPO de roedor. En otras realizaciones, el

roedor genéticamente modificado que expresa TPO humana no expresa TPO de roedor.

En algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado objeto de la invención es inmunodeficiente. Se entiende por "inmunodeficiente," que el roedor es deficiente en uno o más aspectos de su sistema inmune nativo, p.ej. el roedor es deficiente en uno o más tipos de células inmunes huésped funcionales, p.ej., deficiente en número y/o función de linfocitos B no humanos, número y/o función de linfocitos T no humanos y/o, número y/o función de células NK no humanas.

A modo de ejemplo, el roedor inmunodeficiente puede tener deficiencia combinada grave (SCID). SCID se refiere a una afección caracterizada por la ausencia de linfocitos T y la falta de linfocito B funcional. Entre los ejemplos de SCID se incluyen: SCID unido a X, que se caracteriza por mutaciones génicas de cadena gamma o una pérdida del gen IL2RG y el fenotipo de linfocito T(-) B(+) NK(-); y SCID recesiva autosómica caracterizada por mutaciones del gen Jak3 y el fenotipo de linfocitos T(-) B(+) NK(-), mutaciones del gen ADA y el fenotipo de linfocitos T(-) B(-) NK(-), mutaciones de cadena alfa de IL-7R y el fenotipo de linfocitos T(-) B(+) NK(+), mutaciones de CD3 delta o épsilon y el fenotipo de linfocitos T(-) B(+) NK(+), mutaciones RAG1/RAG2 y el fenotipo de linfocitos T(-) B(-) NK(+), mutaciones del gen Artemis y el fenotipo de linfocitos T(-) B(-) NK(+), mutaciones del gen CD45 y el fenotipo de linfocitos T(-) B(+) NK(+) y mutaciones de Prkdc^{scid} (Bosma et al. (1989, Immunogenetics 29:54-56) y el fenotipo de linfocitos T(-), B(-), linfopenia y hipoglobulinemia. Así pues, en algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado inmunodeficiente tiene una o más deficiencias seleccionadas entre deficiencia de cadena gamma del receptor de IL-2, mutación del gen ADA, una mutación IL7R, una mutación de CD3, mutación de RAG1 y/o RAG2, una mutación de Artemis, una mutación de CD45 y una mutación de Prkdc.

En ciertas realizaciones, el roedor objeto de la invención es un ratón o una rata.

En una realización, el roedor se selecciona entre un ratón, una rata y un hámster. En una realización, el roedor se selecciona dentro de la familia de los *Muroidea*. En una realización, el roedor genéticamente modificado es de una familia seleccionada entre *Calomyscidae* (p.ej., hámster de tipo ratón), *Cricetidae* (p.ej., hámster, ratas y ratones del Nuevo Mundo y topillos), *Muridae* (ratones y ratas comunes, gerbos, ratones espinosos, ratas de crin), *Nesomyidae* (ratones trepadores, ratones de las rocas, ratas de cola blanca, ratas y ratones de Madagascar), *Platacanthomyidae* (p.ej., lirón espinoso) y *Spalacidae* (p.ej., ratas topo, ratas bambú y zokor). En una realización específica, el roedor genéticamente modificado se selecciona entre un ratón o una rata común (familia *Muridae*), un gerbo, un ratón espinoso o una rata con crín. En una realización, el ratón genéticamente modificado es un miembro de la familia de los *Muridae*.

En una realización, el roedor no humano modificado genéticamente objeto de la invención es una rata. En una de dichas realizaciones, la rata se selecciona entre una rata Wistar, una cepa LEA, una cepa Sprague Dawley, una cepa Fischer, F344, F6 y Dark Agouti. En otra realización, la cepa de la rata es una mezcla de dos o más cepas seleccionadas del grupo que consiste en Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6 y Dark Agouti.

En otra realización, el roedor genéticamente modificado objeto de la invención es un ratón, p.ej. un ratón de una cepa C57BL (p.ej. C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, C57BL/Ola, etc.); un ratón de la cepa 129 (p.ej. 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (p.ej., 129S1/SV, 129S1/Svlm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2); un ratón de la cepa BALB; p.ej., BALB/c; y similares. Véase, p.ej., Festing et al. (1999) Mammalian Genome 10:836, véase también, Auerbach et al. (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines). En una realización concreta, el ratón genéticamente modificado es una mezcla de las cepa 129 antes mencionada, y la cepa C57BL/6. En otra realización concreta, el ratón es una mezcla de las cepas 129 antes mencionadas o una mezcla de las cepas BL/6 antes mencionadas. En una realización concreta, la cepa 129 de la mezcla es la cepa 129S6 (129/SvEvTac). En otra realización más, el ratón es una mezcla de la cepa BALB y otra cepa mencionada.

Así pues, por ejemplo, en algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado objeto de la invención es un ratón inmunodeficiente deficiente en el número y/o función de linfocitos B y/o el número y/o función de linfocitos T y/o el número y/o función de células NK (por ejemplo, debido a una deficiencia de la cadena gamma del receptor de IL-2 (es decir, $\gamma c^{-/-}$) y/o una deficiencia RAG) y que tienen un genoma que comprende un ácido nucleico humano, p.ej. un ácido nucleico que codifica IL-6 humana, hM-CSF, hIL-3, hGM-CSF, hTPO y/o hSIRPa, unido operativamente a su correspondiente promotor, p.ej. *MCSF*, *IL-3*, *GM-CSF*, *TPO* o promotor de *SIRPa*, respectivamente, en el que el roedor expresa la(s) proteína(s) humana(s) codificadas.

En ciertas realizaciones concretas, el roedor genéticamente modificado objeto de la invención es un ratón inmunodeficiente que comprende un ácido nucleico que codifica IL-6 humana unido operativamente a un promotor de *IL-6* en el locus de *IL-6* de ratón y un ácido nucleico que codifica *SIRPa* humana unida operativamente al promotor de *SIRPa* humana integrado de forma aleatoria en el genoma del roedor (es decir, el ratón expresa *SIRPa* de ratón), es decir, un ratón inmunodeficiente hIL-6, hSirpun, p.ej. un ratón *Rag2^{-/-}IL2rg^{-/-}IL-6^{h/h}hSIRPa⁺* o un ratón *Rag2^{-/-}IL2rg^{-/-}IL-6^{h/h}hSIRPa⁺*. En algunas de dichas realizaciones, el ratón comprende además un ácido nucleico que codifica un M-CSF humano unido operativamente a un promotor de *M-CSF*, un ácido nucleico que codifica IL-3

humana unido operativamente a un promotor de *IL-3*, un ácido nucleico que codifica GM-CSF humano unido operativamente a un promotor de *GM-CSF* y un ácido nucleico que codifica TPO humana unido operativamente a un promotor de *TPO*, es decir un ratón inmunodeficiente hIL-6, hSirpa, hM-CSF, hIL-3, hGM-CSF, hTPO, p.ej. un ratón *Rag2^{-/-}IL2rg^{-/-} IL-6h⁺ M-CSFh⁺ IL-3h⁺ GM-CSFh⁺ TPOh⁺ hSIRPa⁺*, un ratón *Rag2^{-/-}IL2rg^{-/-} IL-6h⁺ M-CSF^{h/h} IL-3^{h/h} GM-CSF^{h/h} TPO^{h/h} hSIRPa⁺*.

En ciertas realizaciones concretas, el roedor genéticamente modificado objeto de la invención es un ratón inmunodeficiente ratón que comprende un ácido nucleico que codifica IL-6 humana unido operativamente a un promotor de *IL-6* y deficiente para IL-6 de ratón, un ácido nucleico que codifica SIRPa humana unido operativamente al promotor de SIRPa humana integrado de forma aleatoria en el genoma del animal no humano (es decir, el ratón sigue expresando SIRPa de ratón), un ácido nucleico que codifica M-CSF humano unido operativamente a un promotor de *M-CSF* y deficiente en M-CSF de ratón, un ácido nucleico que codifica IL-3 humana unido operativamente a un promotor de *IL-3* y deficiente en IL-3 de ratón, un ácido nucleico que codifica GM-CSF humano unido operativamente a un promotor de *GM-CSF* y deficiente en GM-CSF de ratón y un ácido nucleico que codifica TPO humana unido operativamente a un promotor de *TPO* y deficiente en TPO de ratón, es decir un ratón *Rag2^{-/-}IL2rg^{-/-} IL-6^{h/h} MCSF^{h/h} IL-3^{h/h} GM-CSF^{h/h} TPO^{h/h}, hSIRPa⁺*.

Métodos de enmascaramiento de roedores genéticamente modificados

Los roedores genéticamente modificados objeto de la invención se pueden generar utilizando un método conveniente para la generación de los roedores genéticamente modificados, como por ejemplo los conocidos en la técnica, o tal como se describe en el presente documento.

Por ejemplo, se puede incorporar un ácido nucleico que codifica la proteína humana de interés, p.ej., IL-6, hM-CSF, hIL-3, hGMCSF, hTPO o hSIRPa, en un vector recombinante en una forma adecuada para la inserción en el genoma de las células huésped y la expresión de la proteína humana en una célula huésped no humana. En varias realizaciones, el vector recombinante incluye una o más secuencias reguladoras operativamente unidas al ácido nucleico que codifica la proteína humana de manera que permite la transcripción del ácido nucleico en ARNm y la traducción del ARNm en la proteína humana, tal como se ha descrito anteriormente. Debe entenderse que el diseño del vector dependerá de factores como la selección de la célula huésped que se han de transfectar, la cantidad de proteína humana que se va a expresar y/o de cómo el ácido nucleico codificante se integrará en el genoma del huésped no humano, p.ej., tal como se conoce en la técnica.

Por tanto se puede utilizar cualquiera de los diversos métodos para introducir la secuencia de ácidos nucleicos humana en una célula animal para producir un animal genéticamente modificado que expresa el gen humano. Dichas técnicas son muy conocidas en la técnica e incluyen, sin limitarse a ellas, microinyección pronuclear de ovocitos, transformación de células madre, recombinación homóloga y técnicas de activación de genes. Los métodos para generar animales genéticamente modificados que se pueden utilizar incluyen, pero sin limitarse a ellas, las descritas en Sundberg and Ichiki (2006, Genetically Engineered Mice Handbook, CRC Press), Hofker and van Deursen (2002, Genetically modified Mouse Methods and Protocols, Humana Press), Joyner (2000, Gene Targeting: A Practical Approach, Oxford University Press), Turksen (2002, Embryonic stem cells: Methods and Protocols in Methods Mol Biol., Humana Press), Meyer et al. (2010, Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos 107:15022-15026) y Gibson (2004, A Primer Of Genome Science 2^a ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer), patente estadounidense. No. 6.586.251, Rathinam et al. (2011, Blood 118:3119-28), Willinger et al., (2011, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos, 108:2390-2395), Rongvaux et al., (2011, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos, 108:2378-83) y Valenzuela et al. (2003, Nat Biot 21:652-659).

Por ejemplo, se pueden crear los roedores genéticamente modificados objeto de la invención introduciendo el ácido nucleico que codifica la proteína humana en un ovocito, p.ej. por microinyección y permitiendo que se desarrolle el ovocito en el animal de acogida hembra. En realizaciones preferentes, se injerta la construcción que comprende la secuencia de ácidos nucleicos humana en los ovocitos fertilizados. Se pueden recoger los ovocitos fertilizados desde hembras superovuladas el día después del apareamiento e inyectar la construcción de expresión. Los ovocitos inyectados o bien se cultivan durante toda la noche o bien se transfieren directamente a los oviductos del hembras pseudo preñadas p.c. de 0,5 días. Los métodos para la superovulación, recogida de ovocitos, inyección de la construcción de expresión y transferencia al embrión son conocidos en la técnica y se describen en Manipulating the Mouse Embryo (2002, A Laboratory Manual, 3^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Se puede evaluar el vástago en cuanto a la presencia del ácido nucleico introducido por análisis de ADN (p.ej., PCR, transferencia de Southern, secuenciación de ADN, etc.) o a través de un análisis de proteínas (p.ej. ELISA, transferencia de Western, etc.). Dichos métodos tienen como resultado normalmente la integración aleatoria de la secuencia de ácidos nucleicos inyectada – en este caso, la construcción que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína humana de interés – en el genoma del ovocito y, en consecuencia, el animal no humano, es decir, en un locus distinto al locus en el animal huésped que se expresa la correspondiente proteína.

Según otro ejemplo, se puede transfectar la construcción que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína humana en células madre (células ES o células iPS) utilizando métodos muy conocidos, como electroporación, precipitación con fosfato cálcico, lipofección, etc. Se pueden evaluar las células en cuanto a la presencia del ácido

nucleico introducido por análisis de ADN (p.ej., PCR, transferencia de Southern, secuenciación de ADN, etc.) o por análisis de proteína (p.ej. ELISA, transferencia de Western, etc.). Las células que según se ha determinado han incorporado la construcción de expresión se pueden introducir en embriones de pre-implantación. Para una descripción más detallada de los métodos conocidos en las técnicas útiles para las composiciones y métodos de la invención, véase Nagy et al., (2002, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Nagy et al. (1990, *Development* 110:815-821), patente estadounidense. No. 7.576.59, patente estadounidense No. 7.659.442, patente estadounidense. No. 7.294.754 y Kraus et al. (2010, *Genesis* 48:394-399). Dichos métodos se utilizan normalmente en la integración dirigida de la secuencia de ácidos nucleicos transfectada – en este caso la construcción que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína humana de interés – en el genoma de las células madre y, por tanto, el roedor. Frecuentemente, dichos métodos tienen como resultado el reemplazamiento del material genómico huésped, p.ej., material genómico que codifica la proteína huésped correspondiente, por el ácido nucleico que codifica la proteína humana de interés.

Se puede utilizar un roedor fundador genéticamente modificado para reproducir animales adicionales que lleven la modificación genética. Los roedores genéticamente modificados que llevan un ácido nucleico que codifica la(s) proteína(s) humana(s) de la presente divulgación se pueden reproducir además con otros roedores genéticamente modificados que llevan otras modificaciones genéticas o se pueden reproducir animales en los que se ha desactivado un gen, p. ej., un animal con un gen desactivado que no expresa uno o más de sus genes.

En algunas realizaciones, los roedores genéticamente modificados inmunodeficientes comprenden un genoma que incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido humano unido operativamente a un promotor, en el que el roedor expresa el polipéptido humano codificado. En varias realizaciones, los roedores genéticamente modificados inmunodeficientes comprenden un genoma que comprende un casete de expresión que incluye un ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido humano, en el que el ácido nucleico está unido operativamente a un promotor y una señal de poliadenilación y contiene además un intrón y en el que el roedor expresa el polipéptido humano codificado.

Tal como se ha explicado anteriormente, en algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado objeto de la invención es un roedor inmunodeficiente. Igualmente, se pueden generar roedores genéticamente modificados que son inmunodeficientes y comprenden una o más citoquinas humanas, p.ej. IL-6, M-CSF, IL-3, GM-CSF, TPO, y/o SIRPa, aplicando cualquier método conveniente para generar los roedores genéticamente modificados, p.ej. tal como se conoce en la técnica o como se ha descrito en el presente documento, p.ej. inyección de ADN de una construcción de expresión en un embrión de pre-implantación o mediante el uso de células madre, como por ejemplo células madre embrionarias (ES) o células madre pluripotentes inducidas (iPs), por ejemplo, que comprenden un alelo de gen de SCID mutante que, cuando es homocigoto, tiene como resultado inmunodeficiencia, tal como se ha descrito con mayor detalle anteriormente y en los ejemplos prácticos del presente documento. Los ratones se generan pues con el ovocito modificado o células ES aplicando los métodos descritos en el presente documento o conocidos dentro de la técnica y se aparean para producir ratones inmunodeficientes que comprenden la modificación genética deseada. Según otro ejemplo más, se pueden generar los roedores genéticamente modificados en un entorno no inmunodeficiente y cruzarse con un animal que comprende un alelo del gen de SCID mutante que, cuando es homocigoto, tendrá como resultado inmunodeficiencia y aparear la progenie para crear un animal inmunodeficiente que expresa la al menos una proteína humana de interés.

Las distintas realizaciones de la invención proporcionan roedores genéticamente modificados que incluyen un ácido nucleico humano en sustancialmente todas sus células, así como roedores genéticamente modificados que incluyen un ácido nucleico humano en alguna pero no en todas sus células. En algunos casos, p.ej. recombinación dirigida, una copia del ácido nucleico humano estará integrada en el genoma de los roedores genéticamente modificados. En otros casos, p.ej., integración aleatoria, múltiples copias, adyacentes o distantes entre sí, del ácido nucleico humano pueden estar integradas en el genoma de los roedores genéticamente modificados.

Por tanto, en algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado objeto de la invención puede ser un roedor inmunodeficiente que comprende un genoma que un ácido nucleico que codifica un polipéptido humano unido operativamente al promotor del roedor correspondiente, en el que el roedor expresa polipéptido humano codificado. Es decir, el roedor genéticamente modificado inmunodeficiente objeto de la invención comprende un genoma que comprende un casete de expresión que incluye un ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido humano, en el que el ácido nucleico está unido operativamente al promotor del roedor correspondiente y una señal de poliadenilación y en el que el roedor expresa el polipéptido humano codificado.

Utilidad

Los roedores genéticamente modificados que se proporcionan en varias realizaciones de la presente invención encuentran muchos usos, entre los que se incluyen, por ejemplo, su uso como modelos de crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas y para la evaluación *in vivo* de hematopoyesis humana, para la evaluación *in vivo* de células cancerosas, para el estudio de una respuesta inmune, o para la evaluación *in vivo* de vacunas y regímenes de vacunación, para su uso en la determinación por ensayo de agentes que modulan el crecimiento o supervivencia de células cancerosas, para la evaluación *in vivo* del tratamiento de cáncer, para la producción *in vivo* y recogida de mediadores inmunes, como por ejemplo un anticuerpo para su uso para determinar

por ensayo el efecto de agentes que afectan la función hematopoyética y de célula inmune.

Para este fin, en algunos casos, el roedor genéticamente modificado objeto de la invención (un "huésped") se injerta con al menos una célula hematopoyética humana. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para producir un modelo de roedor para estudios para el sistema hematopoyético humano, que comprende el injerto de células hematopoyéticas humanas en un roedor genéticamente modificado objeto de la invención (el "huésped"). En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para injertar células hematopoyéticas humanas en el roedor genéticamente modificado divulgado en el presente documento.

En algunos casos en particular, se injerta el roedor genéticamente modificado objeto de la invención con al menos una célula de mieloma múltiple humana. En algunas de dichas realizaciones, se proporcionan métodos para producir un modelo de roedor para estudios contra el cáncer que comprende el injerto de células del mieloma múltiple humanas en un roedor genéticamente modificado objeto de la invención. En algunas de dichas realizaciones, la invención es un método de injerto de células del mieloma múltiple humanas en un roedor genéticamente modificado objeto de la invención. El injerto de células del mieloma múltiple humanas útil en las composiciones y métodos de la invención incluye cualquier célula de mieloma múltiple humana.

Las células hematopoyéticas humanas útiles en el injerto de los roedores genéticamente modificados objeto de la invención incluyen cualquier célula hematopoyética humana conveniente. Entre los ejemplos no exhaustivos de células hematopoyéticas humanas útiles en la invención se incluyen, pero sin limitarse a ellas, HSC, HSPC, células de inicio de la leucemia (LIC) y células hematopoyéticas de cualquier linaje en cualquier estadio de diferenciación incluyendo células hematopoyéticas de cualquier linaje diferenciadas terminalmente. En algunos casos, la célula hematopoyética humana es una célula primaria, utilizándose "células primarias", "líneas de células primarias" y "cultivos primarios" indistintamente en el presente documento para incluir células aisladas con precisión, o cultivos de células que se derivan de un sujeto o que se dejan en cultivo *in vitro* durante una serie de pasos limitados, p.ej., divisiones, del cultivo. Por ejemplo, los cultivos primarios son cultivos que pueden haber pasado 0 veces, 1 vez, 2 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces o 15 veces, pero no suficientes veces como para experimentar un estado de crisis. En otras realizaciones, la célula hematopoyética humana es de una línea celular, es decir, la célula es de un cultivo que se ha inmortalizado, p.ej., se ha pasado más de aproximadamente 15 veces. En algunos casos, las células hematopoyéticas que se han injertado comprenden células sanas. En otros casos, las células hematopoyéticas que se han injertado comprenden células hematopoyéticas enfermas, p.ej. células hematopoyéticas cancerosas, p.ej. linfocitos B efectores cancerosos, es decir, células de mieloma múltiple. En algunos casos, las células hematopoyéticas que se han injertado comprenden tanto células sanas como enfermas, p.ej., linfocitos B sanos y linfocitos B efectores cancerosos, linfocitos T sanos y linfocitos B efectores cancerosos, etc.

Las Células hematopoyéticas, es decir, células primarias, líneas celulares generadas de las mismas, etc., se pueden derivar de cualquier tejido o localización de un donador humano, incluyendo, sin limitarse a ellos, la médula ósea, sangre periférica, hígado fetal o sangre del cordón umbilical. Dichas células hematopoyéticas se pueden aislar de cualquier donante humano, incluyendo donantes sanos, así como donantes con enfermedad, por ejemplo cáncer, incluyendo leucemia. El injerto de células hematopoyéticas en el roedor genéticamente modificado objeto de la invención se caracteriza por la presencia de células hematopoyéticas humanas en el roedor injertado. En realizaciones en particular, el injerto de células hematopoyéticas en el roedor genéticamente modificado objeto de la invención se caracteriza por la presencia de células hematopoyéticas humanas diferenciadas en el roedor injertado en el que se proporcionan células hematopoyéticas en comparación con animales de control apropiados.

El aislamiento de células hematopoyéticas humanas, la administración de células hematopoyéticas humanas a un animal huésped y los métodos para evaluar el injerto de las mismas son muy conocidos en la técnica. Las células hematopoyéticas, incluyendo tanto células normales como neoplásicas, o combinaciones de las mismas, para su administración a un animal huésped se pueden obtener desde cualquier tejido que contenga células hematopoyéticas como por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, sangre del cordón umbilical, médula ósea, sangre periférica, citoquinas o sangre periférica movilizada por quimioterapia e hígado fetal. Se pueden encontrar métodos de aislamiento de células hematopoyéticas humanas, de administración de células hematopoyéticas humanas a un animal huésped y de evaluación de injerto de las células hematopoyéticas humanas en el animal huésped en la descripción del presente documento y en Pearson et al. (2008, Curr. Protoc. Immunol. 81:1-15), Ito et al. (2002, Blood 100:3175-3182), Traggiai et al. (2004, Science 304:104-107), Ishikawa et al. (2005, Blood 106:1565-1573), Shultz et al. (2005, J. Immunol. 174:6477-6489) y Holyoake et al. (1999, Exp Hematol. 27:1418-27).

En algunas realizaciones de la invención, se aíslan las células hematopoyéticas humanas, incluyendo tanto células normales como neoplásicas, o combinaciones de las mismas, de un material de origen natural para obtener una población de células enriquecidas para una población hematopoyética en particular (p.ej., HSCs, HSPCs, LICs, CD34⁺, CD34⁻, un marcador específico de linaje, un marcador específico de cáncer, etc.). Las células hematopoyéticas aisladas pueden ser o no una población pura. En una realización, las células hematopoyéticas útiles en las composiciones y métodos de la invención están empobrecidas en células que tienen un marcador en particular. En otra realización, las células hematopoyéticas útiles en las composiciones y métodos de la invención están enriquecidas para la selección de un marcador. En algunas realizaciones, las células hematopoyéticas útiles en las composiciones y métodos de la invención son una población de células en las que las células seleccionadas

constituyen aproximadamente 1-100 % de las células, si bien, en ciertas realizaciones, se puede utilizar también una población de células en la que las células seleccionadas constituyen menos de 1 % del total células. En una realización, las células hematopoyéticas útiles en las composiciones y métodos de la invención están empobrecidas en células que tienen un marcador en particular, como CD34. En otra realización, las células hematopoyéticas útiles en las composiciones y métodos de la invención están enriquecidas para la sección de un marcador, como CD34. En algunas realizaciones, las células hematopoyéticas útiles en las composiciones y métodos de la invención son una población de células en la que las células CD34⁺ constituyen aproximadamente 1-100 % de las células, si bien, en ciertas realizaciones, se puede utilizar también una población de células en las que las células CD34⁺ constituye menos de 1 % del total de células. En ciertas realizaciones, las células hematopoyéticas útiles en las composiciones y métodos de la invención son una población de células empobrecida en Linfocitos T en la que las células CD34⁺ componen aproximadamente 1-3 % del total de células, una población de células empobrecida en linaje en la que las células CD34⁺ componen aproximadamente 50 % del total de células, o una población de células seleccionadas CD34⁺ positivas en la que las células CD34⁺ componen aproximadamente 90 % del total de células.

El número de células hematopoyéticas administradas no se considera limitante en lo que respecta a la generación de un sistema hematopoyético y/o inmune humano en un animal no humano genéticamente modificado que expresa al menos un gen humano. Por tanto, a modo de ejemplo, no exhaustivo, el número de células hematopoyéticas administrado puede oscilar entre aproximadamente 1×10^3 y aproximadamente 1×10^7 , si bien, en varias realizaciones, es posible más o menos. Según otro ejemplo no exhaustivo, el número de HSPC administrado puede oscilar entre aproximadamente 3×10^3 y aproximadamente 1×10^6 células CD34⁺ cuando el receptor es un ratón, si bien en varias realizaciones, es posible usar más o menos. Para otras especies de receptor, el número de células que se debe administrar puede determinarse por experimentación de rutina.

Por ejemplo, en una realización, el ratón genéticamente modificado y tratado está injertado con células hematopoyéticas humanas o células madre hematopoyéticas humanas (HPSC) para formar un ratón genéticamente modificado e injertado. En una realización, las células hematopoyéticas se seleccionan entre células de sangre del cordón umbilical humanas y células de hígado fetal humanas. En una realización, se injertan aproximadamente $1-2 \times 10^5$ Células CD34⁺ humanas.

En algunos casos, la administración de las células hematopoyéticas (p.ej., normales o neoplásicas) puede ir precedida de acondicionamiento, p.ej. o bien irradiación sub-letal del animal receptor con radiación electromagnética de alta frecuencia, generalmente utilizando radiación de rayos X o gamma, o bien tratamiento con un fármaco radiomimético como busulfan o mostaza de nitrógeno. Se cree que el acondicionamiento reduce el número de células hematopoyéticas del huésped, crea factores del microentorno apropiados para el injerto de células hematopoyéticas humanas, y/o crea nichos del microentorno para el injerto de células hematopoyéticas humanas. Los métodos convencionales para el acondicionamiento son conocidos dentro de la técnica, como por ejemplo los descritos en el presente documento y en J. Hayakawa et al, 2009, Stem Cells, 27(1):175-182. En una realización, se trata al ratón genéticamente modificado para eliminar células hematopoyéticas endógenas que puedan existir en el ratón. En una realización, el tratamiento comprende la irradiación del ratón genéticamente modificado. En una realización concreta, se irradia subletalmente crías de ratones recién nacidos genéticamente modificados. En una realización concreta, se irradia las crías recién nacidas con 2×200 cGy con un intervalo de cuatro horas.

Las células hematopoyéticas (p.ej., normales o neoplásicas) se pueden administrar a animales recién nacidos o adultos a través de varias rutas de administración, como por ejemplo, pero sin limitarse a ellas, intravenosa, intrahepática, intraperitoneal, intrafemoral y/o intratibial. Se proporcionan métodos de injerto de células hematopoyéticas humanas, incluyendo tanto células normales como neoplásicas, o combinaciones de las mismas, en roedores inmunodeficientes de acuerdo con las realizaciones de la presente invención que incluyen proporcionar células hematopoyéticas humanas a los roedores inmunodeficientes con o sin radiación de los roedores antes de la administración de las células hematopoyéticas. Se proporcionan métodos para el injerto de células hematopoyéticas humanas en animales inmunodeficiente de acuerdo con las realizaciones de la presente invención que incluyen proporcionar células hematopoyéticas humanas, incluyendo células normales y neoplásicas células, o combinaciones de las mismas a los roedores genéticamente modificados de la invención, administrando o no un fármaco radiomimético, como busulfan o mostaza de nitrógeno a los roedores antes de la administración de las células hematopoyéticas.

El injerto de células hematopoyéticas humanas, incluyendo tanto células normales como neoplásicas, o combinaciones de las mismas en el roedor genéticamente modificado de la invención se puede valorar a través de distintos métodos, como por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, análisis de citometría de flujo de las células en los animales a los que se han administrado las células hematopoyéticas humanas en uno o más momentos tras la administración de las células hematopoyéticas.

Generalmente, se puede considerar el éxito del injerto cuando el número (o porcentaje) de células hematopoyéticas humanas, incluyendo tanto células normales como neoplásicas, o combinaciones de las mismas, presentes en el roedor genéticamente modificado es superior al número (o porcentaje) de células humanas que se han administrado al roedor, en un momento dado más allá de la duración de las células hematopoyéticas humanas administradas. La detección de la progenie de las células hematopoyéticas administradas se puede conseguir por detección de ADN

- humano en el animal receptor, por ejemplo, por detección de células hematopoyéticas humanas intactas, como por ejemplo por detección de marcador de la célula humana, como CD45 humano, CD34 humano, o sIL-6R por ejemplo. La transferencia en serie de células hematopoyéticas humanas desde un primer receptor a un receptor secundario y el injerto de las células hematopoyéticas humanas en el segundo receptor es otra prueba opcional más para someter a ensayo el injerto del receptor primario. El injerto se puede detectar por citometría de flujo como 0,05 % o más células CD45+ humanas en la sangre, el bazo, la médula ósea a los 1-4 meses tras la administración de las células hematopoyéticas humanas. Se puede usar una citoquina (p.ej., GM-CSF) para movilizar células madre, por ejemplo, tal como se describe en Watanabe (1997, Bone Marrow Transplantation 19:1175-1181).
- 5
- 10 En una realización, el roedor genéticamente modificado inmunodeficiente e injertado da lugar a una célula humana seleccionada entre una célula CD34⁺, una célula madre hematopoyética, una célula hematopoyética, una célula precursora mielóide, una célula mielóide, una célula dendrítica, un monocito, un granulocito, un neutrófilo, un mastocito, un timocito, un linfocito T, un linfocito B, una plaqueta y una combinación de las mismas. En una realización, la célula humana está presente a los 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 12 meses del injerto.
- 15
- En una realización, el roedor genéticamente modificado inmunodeficiente e injertado da lugar a un sistema hematolinfoide humano que comprende células hematopoyética madre y progenitoras humanas y células progenitoras mieloides humanas, células mieloides humanas, célula dendríticas humanas, monocitos humanos, granulocitos humanos, neutrófilos humanos, mastocitos humanos, timocitos humanos, linfocitos T humanos, linfocitos B humanos y plaquetas humanas. En una realización, el sistema hemato-linfoide humano está presente a los 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 12 meses del injerto.
- 20
- En una realización, el roedor genéticamente modificado inmunodeficiente e injertado da lugar a un sistema hematolinfoide humano que comprende células hematopoyéticas cancerosas humanas, por ejemplo, células plasmáticas neoplásicas (linfocitos B efectores). En una realización, las células hematopoyéticas cancerosas humanas están presentes a las 4 semanas, a las 6 semanas, a las 8 semanas, a las 12 semanas más de 12 semanas tras el injerto. En ciertas realizaciones, las células hematopoyéticas cancerosas humanas están presentes a las 2 semanas, a las 4 semanas, a las 6 semanas, a las 8 semanas, a las 12 semanas o a más de 12 semanas tras el injerto.
- 25
- 30 Una vez injertado con células hematopoyéticas humanas, los roedores genéticamente modificados objeto de la invención encuentran muchos usos en la técnica. Por ejemplo, los roedores genéticamente modificados injertados de la presente divulgación son útiles para estudiar la función de las células hematopoyéticas humanas en la sangre periférica. Tal como se ha demostrado en el ejemplo práctico 2, los ratones genéticamente modificados que son inmunodeficiente y comprenden un ácido nucleico que codifica IL-6 humana unido operativamente a un promotor de IL-6 en el locus IL-6 de ratón (p.ej., ratones *Rag2^{-/-}IL2rg^{null}IL-6^{h/h}*, ratones *Rag2^{-/-}IL2rg^{null}IL-6^{h/h} hSIRPa⁺* y *Rag2^{-/-}IL2rg^{-/-} IL-6^{h/h} M-CSF^{h/h} IL-3^{h/h} GM-CSF^{h/h} TPO^{h/h} hSIRPa⁺*) soportan el injerto de células hematopoyéticas humanas, p.ej., células progenitoras CD34⁺, en la sangre periférica y el bazo mejor que los ratones inmunodeficiente que no expresan IL-6 humana, es decir, ratones *Rag2^{-/-}IL2rg^{null}*. Por otra parte, estos ratones genéticamente modificados promueven la diferenciación de células hematopoyéticas humanas más eficientemente que los ratones inmunodeficiente que no expresan IL-6 humana. Por ejemplo, estos ratones genéticamente modificados promueven mejor la diferenciación de linfocitos B CD5⁺ y linfocitos B CD27⁺. CD5 es una proteína que se encuentra en un subgrupo de linfocitos B secretores de IgM denominados linfocitos B-1 y sirve para mitigar las señales de activación del receptor de linfocitos B de manera que los linfocitos B-1 solamente puedan activarse con estímulos muy intensos (como por ejemplo proteínas bacterianas) y no por proteínas de tejido normal. CD27 es un marcador para los linfocitos B de memoria. Asimismo, estos ratones genéticamente modificados soportan el desarrollo de células hematopoyéticas humanas de mejor funcionamiento que los ratones inmunodeficiente que no expresan IL-6 humana. Por ejemplo, los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas que secretan IgG más rápidamente en estos ratones modificados genéticamente que en los ratones inmunodeficiente que no expresan IL-6 humana. Como tales, los roedores genéticamente modificados injertados de la presente divulgación encuentran uso en el estudio del desarrollo y función de células hematopoyéticas y, más en particular, en la diferenciación y función de linfocitos B.
- 35
- 40
- 45
- 50
- Según otro ejemplo, los roedores genéticamente modificados injertados de la presente divulgación son útiles para estudiar cánceres hematopoyéticos. Tal como se demuestra en el ejemplo práctico 1 a continuación, los ratones genéticamente modificados que son inmunodeficiente y que comprenden un ácido nucleico que codifica IL-6 humana unido operativamente a un promotor de IL-6 en el locus de IL-6 de ratón, p.ej. ratones *Rag2^{-/-}IL2rg^{null}IL-6^{h/h}*, ratones *Rag2^{-/-}IL2rg^{null}IL-6^{h/h} hSIRPa⁺* y *Rag2^{-/-}IL2rg^{-/-} IL-6^{h/h} M-CSF^{h/h} IL-3^{h/h} GM-CSF^{h/h} TPO^{h/h} hSIRPa⁺*, injertados con células primarias del mieloma múltiple humanas y células de líneas celulares de mieloma múltiple, mientras que los ratones inmunodeficiente que no expresan IL-6 humana, es decir, ratones *Rag2^{-/-}IL2rg^{null}*, no. La expresión de SIRPa humana por un huésped modificado genéticamente mejora además la tasa y grado de injerto observado. Asimismo, el injerto de células de mieloma múltiple directamente al hueso de estos ratones genéticamente modificados inmunodeficiente, divulgados en el presente documento reproduce la patología ósea asociada normalmente con mieloma múltiple humano, p.ej. destrucción y reabsorción ósea, p.ej. según se cuantifica por cribado μ CT.
- 55
- 60
- 65 Como tales, los roedores genéticamente modificados injertados de la presente divulgación encuentran uso en el cribado de agentes candidato para identificar aquellos que sirven para tratar cáncer hematopoyéticos. Los términos

“tratamiento”, “tratar” y similares, tal como se utilizan en el presente documento, incluyen de forma general la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en lo que se refiere a la prevención completa o total de una enfermedad o un síntoma de la misma y/o terapéutico en lo que se refiere a la cura total o parcial de una enfermedad y/o los efectos adversos atribuibles a la enfermedad. “Tratamiento”, tal como se utiliza en el presente documento incluye cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, e incluye: (a) prevención de la enfermedad para que no ocurra en un paciente con predisposición a contraer dicha enfermedad, pero en el que no ha habido diagnóstico de la misma; (b) inhibición de la enfermedad, es decir, detención de su desarrollo; o (c) alivio de la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad. Entre los agentes candidato de interés como agentes terapéuticos para cánceres hematopoyéticos se incluyen los que se pueden administrar antes, durante o después del inicio del cáncer. Es de particular interés el tratamiento en una enfermedad en progreso, en el que el tratamiento estabiliza o reduce los síntomas clínicos no deseables que presenta el paciente. Los términos “individuo”, “sujeto”, “huésped” y “paciente” se utilizan indistintamente en el presente documento e incluyen cualquier sujeto mamífero cuyo diagnóstico exige tratamiento o terapia, en particular, seres humanos.

Según otro ejemplo, los roedores genéticamente modificados injertados de la presente divulgación son útiles para el estudio de patógenos humanos, es decir, patógenos que infectan a seres humanos; la respuesta del sistema inmune humano a la infección de patógenos humanos y la eficacia de los agentes en la protección contra y/o tratamiento de la infección de patógenos humanos. Los patógenos pueden ser un virus, un hongo, una bacteria, etc. Entre los ejemplos no exhaustivos de patógenos virales se incluyen virus de la gripe humana o porcina o aviar. Entre los ejemplos no exhaustivos de patógenos bacterianos se incluyen micobacterias, p. ej. *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) y enterobacterias, p.ej. *Salmonella typhi* (*S. typhi*). Se pueden encontrar ejemplos de métodos para infectar ratones con *S. typhi* y para evaluar la infección, por ejemplo, en la solicitud publicada de Estados Unidos No. 2011/0200982. Se pueden encontrar ejemplos de métodos para infectar ratones con *M. tuberculosis* y para evaluar la infección, por ejemplo, Solicitud publicada de Estados Unidos No. 2011/0200982. Otros ejemplos de patógenos humanos que no infectan ratones de tipo silvestre o que infectan ratones de tipo silvestre pero los ratones infectados no sirven como modelo de una respuesta que equivalga a la respuesta humana al patógeno, son muy conocidos entre las personas especializadas en la técnica. Dichos modelos de ratón de infección de patógeno son útiles en la investigación, p.ej. para entender mejor la progresión de la infección humana. Dichos modelos de ratón de infección también son útiles en el descubrimiento de un fármaco, p.ej. para identificar agentes candidatos que protegen contra una infección o que la tratan.

Los ratones modificados genéticamente injertados de la presente divulgación también proporcionan un sistema útil para cribar agentes candidatos con actividades deseadas *in vivo*, por ejemplo, para identificar agentes que son capaces de modular (es decir, promover o suprimir) el desarrollo y/o actividad de células hematopoyéticas, p.ej., la actividad de linfocitos B, linfocitos T, células NK, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, etc., p.ej. en un estado sano o enfermo, p.ej., células cancerosas, durante la infección del patógeno, por ejemplo, para identificar nuevos agentes terapéuticos y/o desarrollar una mejor comprensión de la base molecular del desarrollo y función del sistema inmune; para los agentes que son tóxicos para las células hematopoyéticas, p.ej. linfocitos B, linfocito T, células NK, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, etc. y progenitores de las mismas y para agentes que previenen contra, mitigan o invierten los efectos tóxicos de agentes tóxicos de células hematopoyéticas, p.ej. linfocitos B, Linfocitos T, células NK, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, etc. y progenitores de los mismos; etc. Según otro ejemplo más, los roedores genéticamente modificados injertados de la presente divulgación proporcionan un sistema útil para predecir la capacidad de respuesta de un individuo a una terapia contra la enfermedad, p.ej., proporcionando una plataforma *in vivo* para cribar la capacidad de respuesta del sistema inmune de un individuo a un agente, p.ej. un agente terapéutico para predecir la capacidad de respuesta de un individuo a dicho agente.

En los ensayos de cribado para agentes biológicamente activos, se pone en contacto una— ratón genéticamente modificado injertado con una célula hematopoyética de la presente invención, p.ej., un ratón injertado *Rag2^{-/-}IL2rg^{-/-}IL-6^{hi/h} hSIRPα⁺*, un ratón injertado *Rag2^{-/-}IL2rg^{-/-}IL-6^{hi/h} M-CSF^{hi/h} IL-3^{hi/h} GM-CSF^{hi/h} TPO^{hi/h} hSIRPα⁺*, etc. con un agente candidato de interés y se evalúa el efecto del agente candidato llevando un seguimiento de uno o más parámetros de salida. Dichos parámetros de salida pueden reflejar la viabilidad de las células, p.ej., el número total de células hematopoyéticas o el número de células de un tipo de célula hematopoyética particular, o del estado apoptótico de las células, p.ej., la cantidad de fragmentación de ADN, la cantidad de protuberancias celulares, la cantidad de fosfatidilserina en la superficie de la célula y similares, a través de los métodos conocidos en la técnica. Alternativamente o adicionalmente, los parámetros de salida pueden reflejar la capacidad de diferenciación de las células, p.ej., las proporciones de células diferenciadas y tipos de células diferenciados. Alternativamente, o adicionalmente, los parámetros de salida pueden reflejar la función de las células, p.ej., las citoquinas o quimioquinas producidas por las células, los anticuerpos (p.ej. cantidad o tipo) producidos por las células, la capacidad de las células para alojar o extravasar un sitio de desafío, la capacidad de las células para modular, es decir, promover o suprimir la actividad de otras células *in vitro* o *in vivo*, etc. Otros parámetros de salida pueden reflejar el grado de daño inducido por las células hematopoyéticas enfermas, p.ej., destrucción o reabsorción del hueso, inducido por células mieloides múltiple. Otros parámetros más pueden reflejar el efecto del agente sobre la infección, p.ej., infección de patógeno en el animal, p.ej., la titulación del patógeno en el ratón, la presencia de granuloma en el ratón, etc., según sea pertinente para los estudios que se estén realizando.

Los parámetros son componentes de células cuantificables, en particular componentes que se pueden medir con precisión, deseablemente en un sistema de alta producción. Un parámetro puede ser cualquier componente de célula o producto de célula incluyendo un determinante de la superficie de la célula, un receptor, una proteína o una modificación conformacional o post-traducción de la misma, lípidos, hidratos de carbono, molécula orgánica o inorgánica, ácido nucleico, p.ej., ARNm, ADN, etc. o una porción derivada de dicho componente celular o una combinación de los mismos. Si bien la mayoría de los parámetros proporcionarán una lectura cuantitativa, en algunos casos, será aceptable un resultado cualitativo. Las lecturas pueden incluir un valor determinado único o pueden incluir una media, una mediana o una varianza, etc. Característicamente, se obtendrá un intervalo de valores de lectura del parámetro para cada parámetro a partir de una multiplicidad de los mismos ensayos. Se espera obtener variabilidad y un intervalo de valores para cada conjunto de parámetros de ensayos empleando los métodos estadísticos normales utilizando un método estadístico común para proporcionar valores únicos.

Los agentes candidatos de interés para el cribado incluyen compuestos conocidos y desconocidos que abarcan numerosas clases químicas, moléculas orgánicas principalmente, que pueden incluir moléculas organometálicas, moléculas inorgánicas, secuencias genéticas, vacunas, antibióticos u otros agentes con propiedades antibióticas supuestamente, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, agentes que han sido aprobados para su uso en seres humanos, etc. Un aspecto importante de la invención es evaluar los fármacos candidatos incluyendo pruebas de toxicidad y similares.

Los agentes candidatos incluyen moléculas orgánicas que comprenden grupos funcionales necesarios para interacciones estructurales, en particular, unión de hidrógeno y, normalmente, incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, frecuentemente, al menos dos grupos químicos funcionales. Los agentes candidato comprenden frecuentemente carbono cíclico o estructuras heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales mencionados. Los agentes candidato también se encuentran entre biomoléculas, incluyendo péptidos, polinucleótidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos, se incluyen fármacos farmacológicamente activos, moléculas genéticamente activas, etc. Los compuestos de interés incluyen agentes quimioterapéuticos, hormonas o antagonistas de hormonas, etc. Entre los ejemplos de agentes farmacéuticos adecuados para la presente invención se incluyen los descritos en "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Goodman and Gilman, McGraw-Hill, Nueva York, N.Y., (1996), 9ª edición. Se incluyen también toxinas y agentes químicos y biológicos para fines bélicos, por ejemplo véase Somani, S. M. (Ed.), "Chemical Warfare Agents," Academic Press, Nueva York, 1992).

Los agentes candidatos de interés para su cribado también incluyen ácidos nucleicos, como por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican ARNsi, ARNsh, moléculas antisentido, o ARNmi, o ácidos nucleicos que codifican polipéptidos. Se dispone de muchos vectores útiles para transferir ácidos nucleicos en células diana. Los vectores se pueden mantener epistémicamente, p.ej., como plasmídicos, ADN de minicírculo, vectores derivados de virus, como citomegalovirus, adenovirus, etc., o se pueden integrar en el genoma de la célula diana, por recombinación homóloga o integración aleatoria, p.ej., vectores derivados de retrovirus como MMLV, HIV-1, ALV, etc. Los vectores se pueden proporcionar directamente al linfocito T objeto de la invención. Es decir, se ponen en contacto las células pluripotentes con vectores que comprenden el ácido nucleico de interés de manera que los vectores son captados por las células.

Los métodos para poner en contacto las células, p.ej., células en cultivo o células en un ratón, con vectores de ácido nucleico, como por ejemplo electroporación, transfección con cloruro cálcico y lipofección, son muy conocidos dentro de la técnica. Alternativamente, se puede proporcionar el ácido nucleico de interés en las células a través de un virus. Es decir, se ponen en contacto las células con partículas virales que comprenden el ácido nucleico de interés. Los retrovirus, por ejemplo lentivirus, son particularmente adecuados para el método de la invención. Los vectores retrovirales utilizados comúnmente son "defectuosos", es decir, no son capaces de producir proteínas virales necesarias para la infección productiva, sino que la replicación del vector requiere el crecimiento de una línea celular empaquetadora. Para generar partículas virales que comprenden ácidos nucleicos de interés, se empaquetan los ácidos nucleicos retrovirales que comprenden el ácido nucleico en cápsides virales mediante una línea celular empaquetadora. Las diferentes líneas celulares empaquetadoras proporcionan una proteína de envoltura diferente incorporada en la cápside, determinando dicha proteína de envoltura la especificidad de la partícula viral para las células. Las proteínas de envoltura son de tres tipos al menos, ecotrópicas, anfotrópicas y xenotrópicas. Los virus empaquetados con una proteína de envoltura ecotrópica, p.ej. MMLV, son capaces de infectar la mayoría de las células murinas y de rata y se generan utilizando líneas celulares empaquetadoras ecotrópicas como BOSC23 (Pear et al. (1993) P.N.A.S. 90:8392-8396). Los retrovirus que llevan una proteína de envoltura anfotrópica, p.ej. 4070A (Danos et al, supra.), son capaces de infectar la mayoría de los tipos de células de mamífero, incluyendo seres humanos, perros y ratones y se generan utilizando líneas celulares empaquetadoras anfotrópicas como PA12 (Miller et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317 (Miller et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902); GRIP (Danos et al. (1988) PNAS 85:6460-6464). Los retrovirus empaquetados con proteína de envoltura xenotrópica, p.ej., AKR env., son capaces de infectar la mayoría de los tipos de células de mamíferos, excepto células murinas. La línea celular empaquetadora apropiada se puede usar para asegurar que se dirigen a las células de interés – en ciertos casos, las células injertadas, en algunos casos, las células del huésped, es decir, el animal genéticamente modificado – las partículas virales empaquetadoras.

Los vectores utilizados para proporcionar el ácido nucleico de interés a las células objeto de la invención comprenderán normalmente promotores adecuados para activar la expresión, es decir, la activación transcripcional del ácido nucleico de interés. Esto puede incluir promotores que actúan de forma ubicua, por ejemplo, el promotor de CMV- β -actina o promotores inducibles como por ejemplo los promotores que activan poblaciones de células en particular o que responden a la presencia de fármacos como tetraciclina. Se entienden por activación transcripcional que la transcripción aumentará por encima de los niveles basales en la célula diana al menos en aproximadamente 10 veces más, al menos aproximadamente 100 veces más, más normalmente al menos aproximadamente 1000 veces más. Por otra parte, los vectores utilizados para proporcionar factores de reprogramación de en las células objeto de la invención pueden incluir genes que se pueden retirar después, p.ej., utilizando un sistema de recombinasa como Cre/Lox, o las células que la expresan destruidas, p.ej. incluyendo genes que dan cabida a la toxicidad selectiva, como herpesvirus, TK, bcl-xs, etc.

Los agentes candidato de interés para el cribado incluyen también polipéptidos. Dichos polipéptidos pueden fusionarse opcionalmente con un dominio de polipéptido que aumenta la solubilidad del producto. El dominio se puede unir al polipéptido a través de un sitio de escisión de proteasa definido, p.ej., la secuencia TEV, que se escinde mediante la proteasa TEV. El engarce puede incluir también una o más secuencias flexibles, p.ej., de 1 a 10 restos de glicina. En algunas realizaciones, la escisión de la proteína de fusión se realiza en un tampón que mantiene la solubilidad del producto, p.ej., en presencia de 0,5 a 2 M de urea, en presencia de polipéptidos y/o polinucleótidos que aumentan la solubilidad y similares. Los dominios de interés incluyen dominios endosomolíticos, p.ej., dominio HA de *influenza*; y otros polipéptidos que ayudan en la producción, p.ej., dominio IF2, dominio GST, dominio GRPE y similares. Adicionalmente, o alternativamente, dichos polipéptidos pueden formularse para mejorar la estabilidad. Por ejemplo, se pueden PEGilar los péptidos, proporcionando el grupo polietilenoxi una potenciación del ciclo vital en la corriente sanguínea. El polipéptido se puede fusionar con otro polipéptido para proporcionar una funcionalidad adicional, por ejemplo, aumentar la estabilidad *in vivo*. Generalmente, dichos socios de fusión son una proteína plasmática estable que puede, por ejemplo, prolongar la semivida en plasma *in vivo* del polipéptido cuando está presente como fusión, en particular, siendo dicha proteína plasmática estable un dominio constante de inmunoglobulina. En la mayoría de los casos cuando la proteína plasmática estable se encuentra normalmente en forma multimérica, p.ej., inmunoglobulinas o lipoproteínas, en las que las mismas o diferentes cadenas de polipéptido son normalmente disulfuro y/o no covalentemente unidas para formar un péptido de multcadena ensamblado, se producirán también las fusiones en el presente documento que contienen el polipéptido y se emplearán como un multímero que tiene sustancialmente la misma estructura que el precursor de proteína plasmática estable. Dichos multímeros serán homogéneos en lo que se refiere al agente de polipéptido que comprenden o pueden contener más de un agente polipéptido.

El agente polipéptido candidato se puede producir a partir de células eucariotas, o se puede producir mediante células procariotas. Se puede procesar asimismo por desplegamiento, p.ej., desnaturalización térmica, reducción DTT, etc. y se puede volver a plegar utilizando métodos conocidos en la técnica. Las modificaciones de interés que no alteran la secuencia primaria incluyen derivación química de polipéptidos, p.ej., acilación, acetilación, carboxilación, amidación, etc. Se incluyen asimismo modificaciones de glucosilación, p.ej., las que se obtienen modificando los patrones de glucosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento posteriores; p.ej. exponiendo el polipéptido a enzimas que afectan a la glucosilación, tales como enzimas glicosilantes o desglicosilantes de mamífero. También se abarcan secuencias que tienen restos de aminoácidos fosforilados, p.ej., fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina. Los polipéptidos pueden haber sido modificados utilizando técnicas de biología molecular habituales y química de síntesis, para mejorar su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar sus propiedades de solubilidad o hacer que sean más adecuadas como agentes terapéuticos. Entre los análogos de dichos polipéptidos se incluyen los que contienen residuos distintos a los L-aminoácidos de origen natural, p. ej. D-aminoácidos y aminoácidos sintéticos de origen no natural. Los D-aminoácidos pueden estar sustituidos por algún o todos los restos de aminoácidos.

El agente polipéptido candidato se puede preparar por síntesis *in vitro* utilizando métodos convencionales conocidos dentro de la técnica. Se dispone de diversos aparatos de síntesis en el mercado, como por ejemplo, sintetizadores automáticos de Applied Biosystems, Inc., Beckman, etc. Al utilizar los sintetizadores, se pueden sustituir aminoácidos de origen natural por aminoácidos no naturales. La secuencia en particular y la forma de preparación será determinada según criterios de conveniencia, economía, pureza y similares. Alternativamente, puede aislarse y purificarse el agente polipéptido candidato de acuerdo con métodos convencionales de síntesis recombinante. Se puede preparar un lisado del huésped de expresión y purificar el lisado utilizando HPLC, cromatografía de exclusión, electroforesis de gel, cromatografía de afinidad u otra técnica de purificación. En su mayoría, las composiciones que se utilizan comprenderán al menos 20 % en peso del producto deseado, más habitualmente al menos aproximadamente 75 % en peso, preferentemente al menos aproximadamente 95 % en peso y para fines terapéuticos, normalmente al menos aproximadamente 99,5 % en peso en relación con los contaminantes relacionados con el método de preparación del producto y su purificación. Normalmente, los porcentajes se basarán en el total de proteínas.

En algunos casos, los agentes polipéptidos candidato que se criben son anticuerpos. Se pretende que el término "anticuerpo" o "fracción de anticuerpo" incluya cualquier estructura molecular que contenga cadena de polipéptido con una forma específica que encaje o que reconozca un epítipo, en el que una o más de las interacciones de unión

no covalentes estabilizan el complejo entre la estructura molecular y el epítipo. El ajuste específico o selectivo de una estructura dada y su epítipo específico se denomina a veces ajuste de "cerradura y llave". La molécula de anticuerpo arquetípica es la inmunoglobulina y todos los tipos de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, *etc.*, de todas las fuentes, *p.ej.* humana, roedores, conejos, vacas, ovejas, cerdos, perros, otros mamíferos, pollos, otras aves, *etc.* se consideran "anticuerpos". Los anticuerpos utilizados en la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos se proporcionan normalmente en el medio en el que se cultivan las células. La producción de anticuerpos y el cribado se describen con mayor detalle más adelante.

Los agentes candidato se pueden obtener de una gran variedad de fuentes incluyendo bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, existen numerosos medios de síntesis aleatoria o directa de una amplia gama de compuestos orgánicos, incluyendo biomoléculas, incluyendo la expresión oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizada. Alternativamente, se dispone de bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos de bacterias, hongos, plantas y animales o se pueden producir fácilmente. Asimismo, las bibliotecas y compuestos producidos por síntesis se pueden modificar fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales y se pueden utilizar para producir bibliotecas combinatorias. Se pueden someter agentes farmacológicos conocidos a modificaciones químicas aleatorias o directas, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, *etc.*, para producir análogos estructurales.

Se criban los agentes candidato en cuanto a su actividad biológica administrando el agente a al menos uno y, normalmente, una pluralidad de muestras, a veces en combinación con muestras que carecen del agente. Se mide el cambio de parámetros como respuesta al agente y se evalúa el resultado comparándolo con cultivos de referencia, *p.ej.*, en presencia y ausencia del agente, obtenidos con otros agentes, *etc.* En los casos en los que se realiza un cribado para identificar agentes candidatos que prevengan, mitiguen o inviertan los efectos de un agente tóxico, el cribado se realiza normalmente en presencia del agente tóxico, en a que se añade el agente tóxico en el momento más apropiado para los resultados que se van a determinar. Por ejemplo, en los casos en los que se somete a ensayo la capacidad protectora/preventiva del agente candidato, se puede añadir el agente candidato antes del agente tóxico, simultáneamente con el agente candidato o después del tratamiento con el agente candidato. En otro ejemplo, en los casos en los que se somete a ensayo la capacidad del agente candidato para invertir los efectos de un agente tóxico, se puede añadir el agente candidato después del tratamiento con el agente candidato. Tal como se ha mencionado, en algunos casos, la "muestra" es un animal no humano genéticamente modificado al que se han injertado células, *p.ej.*, se proporciona el agente candidato a un animal inmunodeficiente, *p.ej.* un ratón que comprende un ácido nucleico que codifica IL-6 humana unido operativamente a un promotor de IL-6 al que se han injertado células hematopoyéticas humanas. En algunos casos, la muestra consiste en las células hematopoyéticas humanas que se van a injertar, es decir, se proporciona el agente candidato a las células antes del injerto en el animal genéticamente modificado inmunodeficiente.

Si el agente candidato se va a administrar directamente al animal genéticamente modificado injertado, se administra el agente a través de cualquiera entre una serie de métodos conocidos dentro de la técnica de administración de péptidos, pequeñas moléculas y ácidos nucleicos a ratones. Por ejemplo, se puede administrar el agente por vía oral, mucosal, tópica, intradérmica o por inyección, *p. ej.*, inyección intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intravenosa o intracraneal y similares. Se puede administrar el agente en un tampón o se puede incorporar en cualquiera entre varias formulaciones, *p.ej.*, por combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado. Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" pueden ser vehículos aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal o del Estado o los que se enumeran en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en mamíferos, como por ejemplo seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, un adyuvante, un excipiente o un soporte con el que se formula un compuesto de la invención para su administración a un mamífero. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser lípidos, *p.ej.*, liposomas, *p.ej.*, dendrímeros de liposoma, líquidos, como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de soja y similares; solución salina, goma de acacia, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Asimismo, se pueden utilizar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular en preparaciones en formas sólidas, semi-sólidas, líquidas o gaseosas, como por ejemplo comprimidos, cápsulas, polvos, granulados, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. El agente puede ser sistémico tras su administración o puede estar localizado para su uso en administración local, administración intramural o para su uso como un implante que actúa para retener la dosis activa en el sitio del implante. El agente activo se puede formular para actividad inmediata o puede formularse para liberación sostenida. Para algunas afecciones, en particular, las afecciones del sistema nervioso central, puede ser necesario formular los agentes para cruzar la barrera hematoencefálica (BBB). Una estrategia para la administración del fármaco a través de la barrera hematoencefálica (BBB) entraña la interrupción de la BBB, ya sea por medios osmóticos, como manitol o leucotrienos, o bioquímicamente mediante el uso de una sustancia vasoactiva como bradiquinina. Se puede co-administrar un agente de interrupción de la BBB con el agente cuando se administran las composiciones por inyección intravascular. Otras estrategias para atravesar la BBB pueden implicar el uso de sistemas de transporte endógenos, incluyendo transcitos mediada por Caveolina-1, transportadores mediados por vehículo como vehículos de glucosa y aminoácido, transcitos mediada por receptor para insulina y transferina y transportadores de flujo activo como p-glicoproteína. Las fracciones de transporte activo también se pueden conjugar con los compuestos terapéuticos

para su uso en la invención para facilitar el transporte a través de la pared endotelial de los vasos sanguíneos. Alternativamente, la administración del fármaco de agente por detrás de la BBB puede ser por administración local, por ejemplo por administración intratecal, p.ej., a través de un depósito de Ommaya (véase p.ej. las patentes estadounidenses Nos. 5.222.982 y 5385582); por inyección de bolo, p.ej. con jeringuilla, p.ej. intravitalmente o intracranalmente; por infusión continua, p.ej. por canulación, p.ej. por convección (véase p.ej. Solicitud estadounidense No. 20070254842); o por implantación de un dispositivo en el que se ha fijado reversiblemente el agente (véase p.ej. Solicitudes estadounidenses No. 20080081064 y 20090196903).

Si se proporciona el (los) agente(s) a células antes del injerto, convenientemente, se añaden los agentes en solución o una forma fácilmente soluble, al medio de células en cultivo. Los agentes pueden añadirse en un sistema de flujo continuo, como una corriente, intermitentemente o continua, o alternativamente añadirse como un bolo del compuesto, en solitario o de forma creciente, a una solución por lo demás estática. En el sistema de flujo continuo, se utilizan dos fluidos, en los que uno es una solución fisiológicamente neutra y el otro es la misma solución con la adición del compuesto de ensayo. El primer fluido pasa sobre las células, seguido del segundo. En un método de una única solución, se añade un bolo del compuesto de ensayo al volumen del medio que rodea las células. Las concentraciones globales de los componentes del medio de cultivo no deberán cambiar significativamente con la adición del bolo o entre las dos soluciones en un método de flujo continuo.

Se puede poner en marcha una pluralidad de ensayos en paralelo con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferente de las distintas concentraciones. Tal como se conoce en la técnica, para determinar la concentración eficaz de un agente se utiliza normalmente un intervalo de concentraciones que son el resultado de diluciones 1:10 u otra escala log. Las concentraciones se pueden refinar más aún con una segunda serie de diluciones, si es necesario. Normalmente una de estas concentraciones sirve como control negativo, es decir, una concentración cero o por debajo del nivel de detección del agente o a una concentración del agente, o por debajo de ella, que no suponga un cambio detectable del fenotipo.

Se puede realizar un análisis de la respuesta de las células en el animal genéticamente modificado injertado para el agente candidato en cualquier momento después del tratamiento con el agente. Por ejemplo, se pueden analizar las células 1, 2, o 3 días, a veces 4, 5 o 6 días, a veces 8, 9, o 10 días, a veces 14 días, a veces 21 días, a veces 28 días, a veces 1 mes o más después del contacto con el agente candidato, p.ej. 2 meses, 4 meses, 6 meses o más. En algunas realizaciones, el análisis comprende el análisis en varios momentos. La sección de los momentos para el análisis se basará en el tipo de análisis que se lleven a cabo, tal como entenderán fácilmente las personas especializadas en la técnica.

El análisis puede comprender la medición de cualquiera de los parámetros descritos en el presente documento o conocidos en la técnica para medir la viabilidad celular, la proliferación celular, la identidad celular, la morfología celular y la función celular, en particular, cuando puedan tener relación con células inmunes. Por ejemplo, se puede utilizar citometría de flujo para determinar el número total de células hematopoyéticas o el número de células de un tipo de célula hematopoyética en particular. La histoquímica o inmunohistoquímica pueden realizarse para determinar el estado apoptótico de las células, p.ej., etiquetado terminal de mella de desoxinucleotidil transferasa terminal dTP (TUNEL) para medir la fragmentación de ADN, o inmunohistoquímica para detectar unión de Anexina V a fosfatidilserina en la superficie de la célula. La citometría de flujo puede emplearse también para valorar las proporciones de células diferenciadas y tipos de células diferenciadas, p.ej., para determinar la capacidad de las células hematopoyéticas de diferenciarse en presencia del agente. Se pueden realizar ensayos ELISA, transferencia de Western o de Northern para determinar los niveles de citoquinas, quimioquinas, inmunoglobulinas, etc., expresadas en los ratones modificados genéticamente injertados, p.ej. para valorar la función de las células injertadas, para evaluar la supervivencia de células plasmáticas cancerosas, etc. Se pueden realizar cribados de μ CT para determinar el grado de daño inducido por las células hematopoyéticas enfermas, p.ej., destrucción o reabsorción ósea inducida por múltiples células mieloides. Se pueden llevar a cabo los ensayos *in vivo* para determinar la función de las células inmunes, así como los ensayos pertinentes para una enfermedad o trastorno en particular de interés, como diabetes, enfermedad autoinmune, enfermedad de injerto frente a huésped, AMD, etc. Véase, p.ej. Current Protocols in Immunology (Richard Coico, ed. John Wiley & Sons, Inc. 2012) e Immunology Métodos Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997).

Así, por ejemplo, se proporciona un método para determinar el efecto de un agente sobre mieloma múltiple, que comprende la administración del agente a un ratón IL-6 humanizado, p.ej. un ratón *Rag2^{-/-}IL2rg^{-/-}IL-6^{h/h}*, al que se han injertado células del mieloma múltiple humanas; la medición de un parámetro de la viabilidad y/o capacidad proliferativa de las células de mieloma múltiple a lo largo del tiempo en presencia del agente; y la comparación de dicha medición con la medición del ratón IL-6 humanizado injertado no expuesto al agente. Se determina que el agente es anticanceroso si reduce la proliferación y/o reduce el número de células de mieloma múltiple en la sangre o el tejido del ratón en al menos 20 %, 30 %, 40 % o más, en algunos casos 50 %, 60%, 70 % o más, p.ej. 80 %, 90 % o 100%, es decir, a cantidades no detectables, tras una sola administración o dos o más administraciones del agente a lo largo de un período de tiempo seleccionado. En una realización específica, la administración del fármaco es al menos a la semana, 10 días, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas del injerto de las células de mieloma múltiple.

Otros ejemplos de usos de los ratones objeto de la invención se proporcionan a lo largo del presente documento. Las aplicaciones adicionales de los ratones modificados genéticamente e injertados descritas en la presente divulgación se pondrán de manifiesto para las personas especializadas en la técnica tras la lectura de la presente divulgación.

- 5 Producción de anticuerpo humano
- 10 Se proporciona asimismo composiciones y métodos útiles para la producción de anticuerpos monoclonales humanos a partir de un roedor injertado inmunodeficiente, tal como se describe a lo largo del presente documento. En varias realizaciones, los métodos comprenden el contacto de un roedor inmunodeficiente con una célula hematopoyética humana para generar un roedor con un sistema inmune trasplantado (roedor injertado) poniendo en contacto posteriormente el roedor injertado con un antígeno, recogiendo del roedor injertado una célula humana que produce un anticuerpo humano contra antígeno y aislando el anticuerpo de la célula que produce el anticuerpo.
- 15 Se divulga en el presente documento un método que incluye establecer una célula que produce anticuerpo (p.ej. un linfocito B humano) a través de un método de transformación (p.ej. EBV) o un método de fusión celular (p.ej. hibridoma). Preferentemente, la célula que produce anticuerpo es capaz de mantenerse en condiciones de cultivo celular adecuadas durante al menos aproximadamente 50 pasos.
- 20 En varias realizaciones, el animal injertado es un ratón o una rata.
- La célula hematopoyética humana puede ser una célula CD34⁺ obtenida de un hígado fetal humano, médula ósea, sangre del cordón, sangre periférica o una muestra de hígado.
- 25 El antígeno puede ser al menos un antígeno de un péptido, un polipéptido, un complejo MHC/péptido, ADN, un virus vivo, un virus muerto o una porción del mismo, una bacteria viva, una bacteria muerta o una porción de la misma, o una célula cancerosa o una porción de la misma.
- 30 Se puede poner en contacto el animal injertado con el antígeno 1-5 meses después de que el animal ha sido puesto en contacto con la célula hematopoyética humana. Se puede poner en contacto el animal injertado solamente una vez con el antígeno o se puede poner en contacto el animal injertado dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más veces, con el antígeno.
- 35 La célula que produce el anticuerpo humano recogida del animal injertado puede ser un linfocito B. La célula que produce el anticuerpo humano recogida del animal puede expresar en su superficie al menos uno entre: CD19, CD20, CD22 y CD27. La célula que produce anticuerpo humano se puede recuperar extrayendo cualquier componente celular adecuado del sistema inmune del animal. La célula que produce el anticuerpo se puede extraer del animal injertado extirpando al menos uno entre el hígado, nódulos linfáticos, sangre periférica, médula ósea o porciones de los mismos.
- 40 En varias realizaciones, el método divulgado en el presente documento emplea una tecnología de hibridoma convencional con el uso de un socio de fusión adecuado. El socio de fusión puede ser al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en: MOPC21, P3X63AG8, SP2/0, NS-1, P3.X63AG8.653, F0, S194/5.XXO.BU-1, FOX-NY, SP2/0-Ag14, MEG-01, HEL, UT-7, M07e, MEG-A2 y DAMI y líneas celulares derivadas de estas células.
- 45 Los métodos para aislar un anticuerpo del roedor injertado de la invención son conocidos dentro de la técnica. El aislamiento del anticuerpo desde la célula que produce el anticuerpo, el medio en el que está en cultivo la célula que produce el anticuerpo y/o los ascitos del animal injertado, se puede realizar de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, cromatografía y diálisis. En otras realizaciones diversas, se puede aislar el anticuerpo utilizando uno o más entre purificación por inmunofinidad, precipitación con sulfato de amonio, purificación de proteína A/G, cromatografía de intercambio iónico y filtración de gel. Dichos métodos se describen en Nau (1989, Optimization of monoclonal antibody purification, In: Techniques in Protein Chemistry, Hugli, T. (ed.), Academic Press, Nueva York) y Coligan et al. (2005, Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc.).
- 50 El antígeno se puede administrar al roedor injertado a través de cualquier medio adecuado conocido en la técnica. En varias realizaciones, se puede administrar el antígeno al roedor injertado a través de al menos una entre las vías intraesplénica, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular y subcutánea. En algunas realizaciones, se administra el antígeno en solitario y, en otras realizaciones, se administra el antígeno en combinación con un agente inmunomodulador o adyuvante apropiado. Entre los ejemplos de adyuvantes útiles en los métodos de la invención se incluyen, pero sin limitarse a ellos, adyuvante de Freund completo (CFA), Adyuvante de Freund incompleto (IFA) y Alum (Al₃(OH)₄).

Reactivos y kits

- 65 Se divulgan también reactivos y kits de los mismos para la puesta en práctica de uno o más de los métodos descritos. Los reactivos y kits objeto de la invención pueden variar en gran medida. Los reactivos y kits pueden

comprender uno o más reactivos para su uso en la generación y/o mantenimiento de los roedores genéticamente modificados objeto de la invención. Por ejemplo, el kit puede comprender un ratón inmunodeficiente que comprende un ácido nucleico que codifica IL-6 humana unido operativamente a un promotor de IL-6 y un ácido nucleico que codifica SIRPa humana unido operativamente a un promotor de SIRPa; o un ratón que comprende un ácido nucleico que codifica IL-6 humana unido operativamente a un promotor de IL-6 y que comprende además un ácido nucleico que codifica M-CSF humano unido operativamente a un promotor M-CSF; un ácido nucleico que codifica IL-3 humana unido operativamente a un promotor de IL-3; un ácido nucleico que codifica GM-CSF humano unido operativamente a un promotor GM-CSF; un ácido nucleico que codifica TPO humana unido operativamente a un promotor de TPO; y/o un ácido nucleico que codifica SIRPa humana unido operativamente a un promotor de SIRPa. El kit puede comprender reactivos para reproducir dichos ratones kit, *p.ej.* cebadores para genotipificar el gen de IL-6 humana, para el gen de M-CSF humano, para el gen de IL-3 humana, para el gen de GM-CSF humano, para el gen de SIRPa humana, y/o para el gen de TPO humana, tampón de PCR buffer, solución de MgCl₂, etc.

Los reactivos o kits pueden comprender uno o más reactivos para su uso en el injerto de los roedores genéticamente modificados objeto de la invención, por ejemplo células hematopoyéticas humanas, una población de células hematopoyética progenitoras humanas enriquecida, una línea celular hematopoyética, una línea celular hematopoyética neoplásica, etc. para la implantación en los roedores genéticamente modificados objeto de la invención, o reactivos para preparar una población de células hematopoyéticas, una población de células hematopoyéticas enriquecidas de un ser humano, una línea de células hematopoyética, una línea de células hematopoyética neoplásicas, etc. para su trasplante a roedores genéticamente modificados objeto de la invención.

Los reactivos o kits pueden incluir reactivos para determinar la viabilidad y/o función de células hematopoyéticas, *p.ej.* la presencia/ausencia de un agente candidato, *p.ej.*, uno o más anticuerpos que son específicos para marcadores expresados por diferentes tipos de células hematopoyéticas, o reactivos para detectar citoquinas, quimioquinas, etc. en particular. Otros reactivos pueden incluir medios de cultivo, suplementos de cultivo, composiciones de matriz y similares.

Además de los componentes mencionados, los kits objeto de la invención incluirán además instrucciones para poner en práctica los métodos de la invención. Dichas instrucciones pueden estar presentes en los kits objeto de la invención de diversas formas, pudiendo estar presentes una o más de ellas en el kit. Una forma en la que pueden estar presentes las instrucciones es como información impresa sobre un medio o sustrato adecuado, *p.ej.*, un pliego o pliegos de papel en los que se imprime la información, en el envase del kit, en un envase insertado, etc. Otro medio más sería un medio legible por ordenador, *p.ej.*, disquete, CD, etc. en el que se haya registrado la información. Otro medio más que puede estar presente es una página web que se pueda utilizar vía internet para acceder a la información en un sitio web. En el kit puede estar presente cualquier medio conveniente.

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

A continuación, se describe la invención con mayor detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Dichos ejemplos tienen un fin ilustrativo únicamente y no se pretende que sean exhaustivos a no ser que se especifique de otro modo. Por lo tanto, la invención no se deberá considerar como limitada con los siguientes ejemplos, sino que se deberá considerar que abarca cualquiera y todas las variaciones que se pongan de manifiesto en virtud de las instrucciones que se facilitan en el presente documento.

Sin abundar en la descripción, se considera que las personas especializadas en la técnica podrán preparar y utilizar los compuestos de la presente invención y poner en práctica los métodos reivindicados valiéndose de la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos. Los siguientes ejemplos prácticos por tanto señalan específicamente las realizaciones preferentes de la presente invención y no deberán interpretarse como exhaustivos en absoluto del resto de la divulgación.

Ejemplo 1: La humanización genética de genes de citoquina permite injertar en ratones células de mieloma múltiple humanas.

Los datos que se han descrito en el presente documento demuestran que los animales no humanos modificados genéticamente descritos en el presente documento representan un nuevo modelo animal *in vivo* para mieloma múltiple.

Materiales y Métodos

Se generaron ratones humanizados con activación de gen IL-6 reemplazando 6,8 kb del locus del gen IL-6 murino por la secuencia del gen humano IL-6 de 4,8-kb que contenía exones 1 a 5 que incluía la región 3' sin traducir del gen de IL-6 humana.

Brevemente, se preparó una construcción dirigida para reemplazar en el ratón el gen de IL-6 humana en una sola etapa dirigida utilizando tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® (véase, Valenzuela et al. (2003) Highthroughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech,

21(6):652-659). Se obtuvo ADN de IL-6 humana y de ratón de cromosoma artificial bacteriano (BAC) RPC1-23 clon 368C3 y de BAC CTD clon 2369M23, respectivamente. Brevemente, se sometió a electroporación una construcción dirigida linearizada NotI generada por clonación de reparación de hueco que contiene brazos de homología en dirección 5' en dirección 3' de IL-6 de ratón que flanquean una secuencia humana IL-6 de 4,8 kb que se extiende desde ATG en el exón 1 al exón 5 con 16 nucleótidos de la secuencia en dirección 3' (coordenadas genómicas: NCBIh37.1: ch7:22.766.882 a 22.771.637) y un casete de selección neo flojado, en células ES Rag2^{+/-} IL2rg^{Y/-}. La línea celular ES parental en la que se inactivó el gen RAG2 e IL2rg fue célula ES V17 disponible en el mercado (heterocigoto BALB/cx129). Se pueden someter a electroporación células ES dirigidas correctamente con un vector que expresa Cre transitorio para eliminar el casete de selección del fármaco.

Se identificaron clones de células ES correctamente dirigidas por ensayo de pérdida de alelo nativo (LONA) (Valenzuela et al. 2003) en la que se determinó el número de copias del gen IL-6 nativo sin modificar a través de dos reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativa TaqMan™ (qPCRs) específicas para secuencias en el gen IL-6 de ratón dirigidas para delección. Los ensayos qPCR comprendieron los siguientes conjuntos de cebador-sonda (escrito 5' a 3'): cebador directo en dirección 5', TTGCCGGTTT TCCCTTTTCT C (SEQ ID NO: 1); cebador inverso en dirección 5', AGGGAAGGCC GTGGTTGTC (SEQ ID NO: 2); sonda en dirección 5', FAM-CCAGCATCAG TCCCAAGAAG GCAACT-BHQ (SEQ ID NO: 3); cebador directo en dirección 3', TCAGAGTGTG GGCGAACAAA G (SEQ ID NO: 4); cebador inverso en dirección 3', GTGGCAAAG CAGCCTTAGC (SEQ ID NO: 5); cebador en dirección 3', FAM-TCATTCCAGG CCCTTCTTAT TGCATCTG-BHQ (SEQ ID NO: 6); en la que FAM se refiere a la sonda fluorescente 5-carboxifluoresceína y BHQ se refiere al interruptor de fluorescencia de tipo interruptor de orificio negro (Biosearch Technologies). Se combinó el ADN purificado desde clones de célula ES que han capturado el vector dirigido e incorporado en sus genomas con TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en una placa de PCR de 384-pocillos (MicroAmp™ Optical 384-Well Reaction Plate, Life Technologies) y se cicló en un Prism 7900HT de Applied Biosystems, que recoge los datos de fluorescencia durante el transcurso de la PCR y determina el ciclo umbral (Ct), el ciclo de PCR fraccionado en el que la fluorescencia acumulada llega a un umbral pre-determinado. Se llevaron a cabo las qPCR específicas de IL-6 en dirección 5' y dirección 3' y se pusieron en marcha dos qPCR para genes de referencia no dirigidos para cada muestra de ADN. Se calcularon las diferencias en los valores Ct (ΔCt) entre cada qPCR específica de IL-6 y se calculó cada qPCR de gen de referencia y después la diferencia entre cada ΔCt y la mediana ΔCt para todas las muestras para obtener valores $\Delta\Delta Ct$ para cada muestra. Se calculó el número de copias del gen IL-6 en cada muestra con la siguiente fórmula: número de copias = $2 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Un clon dirigido correctamente, que ha perdido una de sus copias nativas tendrá un número de copias de gen IL-6 igual a uno. Se confirmó que el la secuencia del gen IL-6 humana reemplazó la secuencia del gen IL-6 de ratón suprimida en el alelo humanizado mediante un ensayo qPCR TaqMan™ que comprendió los siguientes conjuntos de cebador-sonda (escrito de 5' a 3'): el cebador directo humano, CCCACTCCACTGGAAATTTG (SEQ ID NO: 7); el cebador inverso humano, GTTCAACCACAGCCAGGAAAG (SEQ ID NO: 8); y la sonda humana, FAMAGCTACAACCTATTGGCATCCTGGCAA- BHQ (SEQ ID NO: 9).

Se diseñó la unión en dirección 5' del locus murino y la secuencia que contiene el gen hIL-6 para que esté dentro de 5'-AATTAGAGAG TTGACTCCTA ATAAATATGA GACTGGGGAT GTCTGTAGCT CATTCTGCTC TGGAGCCCAC CAAGAACGAT AGTCAATTCC AGAAACCGCT ATGAACTCCT TCTCCACAAG TAAGTGCAGG AAATCCTTAG CCCTGGAAT GCCAGCGGCG GTCGAGCCCT GTGTGAGGGA GGGGTGTGTG GCCCAGG (SEQ ID NO: 10), en la que el nucleótido de ratón final antes del primer nucleótido del gen humano es "T" en CCGCT y el primer nucleótido de la secuencia humana es la primera "A" en ATGAA. Se diseñó la unión en dirección 3' de la secuencia que contiene gen hIL-6 y el locus murino para que esté dentro de 5'-TTTTAAAGAA ATATTTATAT TGTATTTATA TAATGTATAA ATGGTTTTTA TACCAATAAA TGGCATTTTA AAAAATTCAG CACTTTGAG TGTGTACGCG TCCCGGGCTC GATAACTATA ACGGTCCTAA GGTAGCGACT CGAGATAACT T-3' (SEQ ID NO: 11), en la que el nucleótido final de la secuencia humana es con la "G" final en TCACG y el primer nucleótido de la secuencia de ratón es la primera "C" en CTCCC; la región de unión en dirección 3' también contenía un sitio loxP en el extremo 3' (al principio de lo mostrado) para la retirada del casete neo accionado por promotor de ubiquitina flojado. La unión del casete neo con el locus IL-6 de ratón se diseñó para que esté dentro de 5'-TATACGAAGT TATCCTAGGT TGGAGCTCCT AAGTTACATC CAAACATCCT CCCCCAATC AATAATTAAG CACTTTTTAT GACATGTAAG GTTAAATAAG AAGTGAAGC TGCAGATGGT GAGTGAGA (SEQ ID NO: 12), en la que la "C" final de AGCTC es el nucleótido final de casete neo; el primer nucleótido del genoma de ratón tras el casete es la "C" inicial de CTAAG.

Para generar un ratón que comprende hIL-6 y que carece de *Rag2* e *Il2rg*, se identifican células ES correctamente dirigidas y se introducen en embriones preimplantación utilizando técnicas conocidas en la técnica.

A continuación, se retrocruzaron ratones KI IL-6 humanizados para generar ratones que carecían de *Rag2* e *Il2rg* y que expresaban hIL-6 y se cruzaron con ratones que expresan un transgen humano SIRPa (Strowig et al., 2011, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos, 108(32): 13218-13223) para generar ratones deficientes en *Rag2* e *Il2rg* y que expresaban también tanto hIL-6 como hSIRPa (*Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{null} *Il6*^{h/h}*SIRPa*⁺). Por otra parte, se cruzaron ratones *Rag2*^{-/-}, *IL-2rg*^{Y/-}, *hIL-6* KI con ratones que expresaban TPO humana (Rongvaux et al., 2011, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos, 108(6): 2378-2383), IL-3 humana y GM-CSF humano (Willinger et al, 2011, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos 108(6): 2390-2395) y M-CSF humano (Rathinam et al, 2011, Blood, 118(11): 3119-3128) así como hSIRPa (Strowig et al., 2011, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos, 108(32): 13218-13223) para generar ratones que

expresaban una combinación de estas proteínas humanas (*Rag2^{-/-} Il2rg^{null} hSIRPa⁺ Tpo^{h/h} Mcsf^{h/h} Il3/Gmcsf^{h/h} Il6^{h/h}*).

Líneas celulares y células primarias. Se mantuvo la línea de células de mieloma múltiple INA-6 (Burger et al., 2001, Hematol J, 2(1): 42-53) en medio RPMI1640 suplementado con 20 % FCS, penicilina/estreptomocina, L-glutamina y 2,5 ng/ml de hIL-6 en una incubadora normal a 37 °C y 5% CO₂.

Se aislaron células primarias de pacientes con mieloma múltiple de aspirados de la médula ósea después de obtener el consentimiento informado de los pacientes. Se purificaron células mononucleares por centrifugación de gradiente de densidad de Ficoll y a continuación, se aislaron subconjuntos de diferentes células por clasificación de células magnéticamente marcadas (MACS®). Para obtener poblaciones con empobrecimiento de linfocitos T, se empobrecieron células CD3⁺ por selección negativa en un sistema AutoMACS utilizando microperlas anti-CD3 (Miltenyi Biotec). Para obtener células CD138⁺, se aislaron células CD138⁺ por selección positiva en un sistema AutoMACS® utilizando microperlas anti-CD138 (Miltenyi Biotec). Se analizó la pureza de las células tras la sección MACS® por citometría de flujo.

Trasplante de las células. Para el trasplante intrafemoral de células INA6, se irradiaron ratones *Rag2^{-/-}Il2rg^{null} Il6^{h/h}SIRPa⁺* dos veces con 200 rad de una fuente de rayos X. Se trasplantaron las cantidades de células indicadas en el fémur de los ratones receptores. Brevemente, se anestesió a los ratones utilizando Ketamina/Xilazina y se perforó un orificio en la superficie patelar del fémur utilizando una aguja de calibre 26. A continuación, se inyectaron lentamente las células en un volumen de 20 µl utilizando una aguja de calibre 27. Para el trasplante de células derivadas de paciente primarias, se irradió ratones *Rag2^{-/-}Il2rg^{null}hSIRPa⁺ Tpo^{h/h} Mcsf^{h/h} Il3/Gmcsf^{h/h} Il6^{h/h}* dos veces con 150 rad desde una fuente de rayos X y se realizó el trasplante tal como se ha descrito.

ELISA. Se utilizaron kits ELISA comerciales para medir las concentraciones de IL-6R soluble humana (R&D Systems), Igk y Igl humana (Bethyl Laboratories). La detección de estas proteínas se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

µCT. Se cuantificó la morfometría del fémur utilizando una tomografía computarizada de rayos X de microfoco de haz cónico (µCT40; ScancoMedicalAG). Se adquirieron imágenes tomográficas en serie y se reconstruyeron imágenes 3D y se utilizaron para determinar los parámetros. Se caracterizó la morfometría trabecular midiendo la fracción del volumen del hueso, el grosor trabecular, el número trabecular y la separación trabecular. Las mediciones corticales incluyeron el grosor cortical promedio, el área transversal del hueso cortical, el área transversal superiosteal y el área de la médula.

Histología. Se despojaron los fémures del tejido blando, se fijaron en 10 % de formalina tamponada, se deshidrataron y se embebieron en metacrilato de metilo antes de seccionarlos y teñirlos con azul de toluidina de acuerdo con los procedimientos normales.

Resultados

Injerto de línea celular de mieloma múltiple en ratones con gen IL-6 humanizado. Se utilizó una línea celular MM dependiente de IL-6 humana para evaluar si los ratones que expresan SIRPα e IL-6 humanas son huéspedes adecuados para líneas celulares de mieloma múltiple (MM). La línea celular INA6-gfp presenta una alta dependencia del microentorno humano, es decir, astillas de hueso fetal humano, cuando se trasplantan en sistemas de xenoinjerto de ratones scid-hu (Epstein et al., 2005, Methods Mol Med, 113: 183-190). Concretamente, las células INA-6 solo pueden injertar el injerto de hueso humano en ratones scid-hu, lo que indica la dependencia de un microentorno de médula ósea humana similar a las células MM primarias (Tassone et al., 2005, Blood, 106(2): 713-716).

Por lo tanto, para someter a ensayo directamente el potencial de humanización IL-6 para permitir el crecimiento de células de mieloma, se trasplantaron células INA-6 en ratones i) *Rag2^{-/-}Il2rg^{null}*, ii) *Rag2^{-/-}Il2rg^{null}hSIRPa⁺*, iii) *Rag2^{-/-}Il2rg^{null} Il6^{h/h}* y iv) *Rag2^{-/-}Il2rg^{null} Il6^{h/h}hSIRPa⁺*. Se analizó el injerto midiendo la proteína sIL-6R secretada por células INA-6 en la sangre. Se detectó el injerto únicamente en ratones que expresaban IL-6 humana (Figura 1) lo que demuestra que las células INA-6 pudieron realmente injertar ratones que expresaban IL-6 humana. A continuación, se investigó el emplazamiento de células INA-6 (modificadas para expresar GFP9) en los ratones injertados por microscopía fluorescente. Se detectaron algunas células GFP⁺ células en la médula ósea (Figura 2), pero se detectó un mayor número de células GFP⁺ en el pulmón de los ratones injertado (Figura 3).

El análisis de la expresión del gen IL-6 humano reveló que el máximo nivel de expresión de gen IL6 humano se encontró en el pulmón (Figura 3), lo que guarda una correlación con la presencia de células INA-6 en el pulmón. En suma, los datos divulgados en el presente documento demuestran el éxito del injerto de células INA-6 tras la inyección intravenosa (i.v.) en ratones genéticamente modificados para expresar IL-6 humana o IL-6 humana y SIRPα, lo que indica que la humanización genética puede superar las restricciones de crecimiento de células MM humanas en ratones.

Los datos de la Figura 3 indican que las células INA-6 no se alojan eficientemente para la médula ósea y que pueden crecer en cambio en sitios no fisiológicos. Por tanto, se examinó a continuación si el trasplante de la línea de

células de tumor en su microentorno natural es capaz o no de reproducir la patología normalmente asociada con MM humana. Para hacerlo, se sometió a prueba la inyección intraósea de células INA-6. De manera sorprendente el resultado fue la destrucción y reabsorción ósea que son aspectos de la patología observada en pacientes MM (Figuras 4-6). Concretamente, se observó la pérdida de masa ósea trabecular por histología, que se cuantificó por μ CT. Por otra parte, se observaron metástasis únicamente limitadas a sitios periféricos, como el pulmón, lo que lleva a la conclusión de que el modelo se puede seguir cribando para investigar nuevos fármacos que interfieren con esta patología. Para investigar esta conclusión, se trataron ratones injertados con INA-6 con Zometa o Velcade, dos fármacos comúnmente utilizados para tratar pacientes con mieloma múltiple. Sorprendentemente, el tratamiento con Zometa de ratones injertados con células INA-6 pudo reducir la reabsorción ósea en comparación con los ratones sin tratar, tal como se cuantificó por μ CT (Figura 7).

Los datos divulgados en el presente documento demuestran que la humanización del gen IL-6 permite el injerto de líneas celulares de mieloma múltiple que requiere normalmente un microentorno humano. El injerto recapitula varios síntomas patológicos observados en pacientes, incluyendo la pérdida ósea. Asimismo, estos síntomas se pueden tratar utilizando fármacos apropiados lo que resalta la utilidad de este modelo para someter a ensayo nuevos fármacos.

La humanización genética de genes de citoquina permite el injerto de células de mieloma múltiple derivadas de paciente primarias. A continuación, se llevaron a cabo experimentos para examinar el trasplante de células MM primarias en ratones genéticamente humanizados. Se había demostrado previamente que la humanización de múltiples citoquinas, incluyendo trombopoyetina, IL-3, GM-CSF y M-CSF así como el receptor inhibidor de macrófago SIRPa tiene como resultado un injerto mejorado de células hematopoyéticas humanas en ratones inmunodeficiente (Strowig et al., 2011, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos, 108(32): 13218-13223; Rathinam et al, 2011, Blood, 118(11): 3119-3128; Rongvaux et al., 2011, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos, 108(6): 2378-2383; Willinger et al, 2011, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos, 108(6): 2390-2395). Concretamente, la humanización de IL-3 y GM-CSF así como MCSF mejoró el injerto de células mieloides que según se ha demostrado son importantes para determinados aspectos de la patología de MM. La expresión transgénica de hSIRPa mejora el injerto de célula humana, si bien el eje SIRPa-CD47 ha sido también relacionado recientemente con tumorigénesis. Se combinaron ratones humanizados previamente generados con ratones en los que se había activado el gen IL-6 humana para genera ratones *Rag2^{-/-}Il2rg^{null}hSIRPa+Tpo^{h/h} Mcsf^{h/h} Il3/Gmcsf^{h/h} Il6^{h/h}*. Para evaluar la capacidad de esta cepa para soportar el injerto de célula humana, se injertaron células de médula ósea empobrecidas en CD3 de pacientes MM en la médula ósea de ratones. Se detectó una alta frecuencia de células de mieloma, identificadas como CD138+CD38+CD19-, en los huesos injertados, al tiempo que se detectaron tan solo unas pocas células en el hueso colateral (Figura 8).

Estos resultados indican que los ratones genéticamente humanizados descritos en el presente documento soportan el injerto de células MM humanas primarias *in vivo*. Estos datos demuestran que la humanización de genes de citoquinas que codifican IL-6, TPO, IL-3, GM-CSF, y/o M-CSF permite el injerto de células primarias de mieloma múltiple de pacientes que requieren normalmente un microentorno humano para que tenga éxito el trasplante.

Ejemplo 2: La humanización genética del gen IL-6 permite el injerto de ratones con células hematopoyéticas humanas.

Materiales y Métodos

Ratones. Se generó el ratón IL-6 KI humanizado, tal como se ha descrito. Se reprodujeron en primer lugar ratones quiméricos con ratones BALBc y después se retrocruzaron para obtener descendencia de homocigóticos hIL-6. Se utilizaron como control ratones con el mismo fondo mixto BALB/c x 129.

Se irradiaron subletalmente los ratones recién nacidos (el primer día de vida) con irradiación de rayos x en un intervalo de 4 horas con 2 x 150 cGy. Cuatro horas después de irradiar a los ratones, se los inyectó 1-2 x10⁵ células CD34⁺ de hígado fetal (HF) en 20 μ l de PBS en el hígado utilizando una aguja de calibre 30 (Hamilton Company, NV, Estados Unidos). Se destetó a los ratones a las 3 semanas de vida. Se mantuvo a los ratones en condiciones desprovistas de patógenos específicas y se llevaron a cabo todos los experimentos en conformidad con los protocolos del Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de Yale.

Análisis de poblaciones de células hematológicas humanas y de ratón Se desangró a los ratones desde el plexo retro-orbital con anestesia con isofluorano en diferentes momentos tras el trasplante. Se recogieron muestras de plasma y se almacenaron a -20 °C para medir Ig posteriormente. Se lisaron los glóbulos rojos de la sangre dos veces utilizando tampón de lisis de cloruro de amonio (ACK) y se resuspendió el resto de PBMC en tampón para FACS (PBS suplementado con 5 % de FBS y 5 mM de EDTA).

Cuando se sacrificó a los ratones, se obtuvo una suspensión celular única de células de la médula ósea (MO), el timo y el hígado. A continuación, se tiñeron las muestras con mAb marcados con fluorocromo contra antígenos de la superficie de la célula humana y de ratón de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron los siguientes mAb anti-humanos: CD45 (HI30), CD19 (HIB19), CD3 (UCHT1), CD4 (RPAT4), CD8 (HIT8a), CD20 (2H7), CD5

(UCHT2), CD27 (0323), CD24 (ML5), CD10 (HI10a), todos ellos de Biolegend, CA, Estados Unidos; CD33 (WM53), CD38 (HIT2), IgM (G20-127), CD138 (MI15) de BD Biosciences y CD34 (AC136) de Miltenyi Biotec. Se tñieron las células de ratón con Ab CD45 Ab anti-murino (30-F11, Biolegend). Se adquirieron las muestras del citómetro LSRII (BD Biosciences) y se analizaron en un software FlowJo (Treestar, OR, Estados Unidos).

5 Medición de inmunoglobulinas humanas. Se midió el total de inmunoglobulinas (Ig) en el plasma recogidas de los ratones por ELISA. Se revistieron placas de 96 pocillos (Nunc, NY, Estados Unidos) A 4 °C durante toda la noche con 20 µg/ml de IgM e IgG de cabra anti-humana purificada (Southern Biotechnology, AL, Estados Unidos). Después del lavado y el bloqueo con PBS 1% albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich) se añadieron diluciones apropiadas de las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente (RT). Se lavaron las placas y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos biotinilados secundarios específicos de isotipo (Southern Biotechnology) seguido de estreptavidina-HRP (Pierce Proteína Research Products, IL, Estados Unidos). Tras el lavado final, se determinó la actividad de la enzima utilizando la solución de sustrato de TMB seguido de la solución de parada (ambas de Pierce Proteína Research Products). Se midió la absorbancia a 450 nm. Se utilizó una muestra de suero humano de Bethyl (TX, Estados Unidos) como referencia.

10 Análisis estadístico. Se expresaron todos los datos como un promedio ± error típico de la media (SEM) con la excepción de los niveles de Ab que se trazaron en gráfico como la media geométrica. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para determinar la importancia estadística entre dos grupos. Se consideraron como significativas las diferencias cuando los valores p estuvieron por debajo de 0,05.

Resultados

25 Injerto de sangre periférica en células humanas CD34⁺ trasplantadas a ratones RAG2^{-/-} yc^{-/-}. Los ratones IL6^{h/h} presentaron un injerto de sangre periférica (PB) superior a lo largo del transcurso del análisis cuando se compararon con ratones IL6^{m/m} y su injerto aumentó con el tiempo (Figura 9). No se observaron diferencias importantes en la composición de las células humanas entre los 2 grupos de ratones en cualquiera de los momentos sometidos a ensayo (Figura 10). En ambos grupos, los porcentajes de linfocitos B y linfocitos T fueron similares a las 8 semanas y a las 16-20 semanas, mientras que a las semanas 11-15, hubo un mayor porcentaje de linfocitos B (69,23 ± 3,97 en IL6^{m/m} y 55,91 ± 4,86 en IL6^{h/h}) que de linfocitos T (16,86 ± 3,14 en IL6^{m/m} t 30,26 ± 6,23 en IL6^{h/h}). Las células CD33⁺ mieloides representaron un componente menor de las células humanas y su porcentaje disminuyó con el tiempo.

30 Injerto de células de órganos y composición de ratones RAG2^{-/-}yc^{-/-} reconstituidos con células CD34⁺ humanas. Se encontraron células de origen humano en los órganos hemato-linfoides, como por ejemplo MO, el bazo y el timo (Figura 11A). Cabe destacar que el bazo de los ratones IL-6^{h/h} desplegó un injerto humano mayor que los ratones IL-6^{m/m} (61,75 % ± 10,87 frente a 23,56 % ± 5,2). Estos datos fueron confirmados por la duplicación del número absoluto del número de células humanas (14,21 x 10⁶ ± 1,38 frente a 7,26 x 10⁶ ± 0.66) (Figura 11B).

35 Maduración de linfocitos B en ratones RAG2^{-/-}yc^{-/-} injertados con células CD34⁺ humanas. Se estudiaron las etapas de maduración de linfocitos B humanos en la MO y el bazo de ratones injertados utilizando las estrategias de gatillado ilustradas en la Figura 12 A, sobre la base del uso de una combinación de anticuerpos IgM CD24, CD38 y de anticuerpo. Esta estrategia es particularmente útil para diseccionar la presencia del subgrupo de linfocitos B transitorios. En MO, el compartimento principal se compuso de linfocitos B Pro/Pre (Figura 12B) sin diferencia entre los ratones IL6^{m/m} y IL6^{h/h} (76,04 % ± 9,09 y 79,07 % ± 3,43 respectivamente). El bazo de ambos grupos tuvo un contenido de algunos linfocitos B maduros (~20%) pero todavía un alto porcentaje de células inmaduras/transitorias (27,13 % ± 8,99 y 36,45 % ± 5,12).

40 Un significativo porcentaje de linfocitos B en el bazo fueron CD5⁺ (Figura 13B), un marcador no comúnmente expresado en linfocitos B periféricos y de MO, pero que se encuentra en un bajo porcentaje en los linfocitos B HF (Figura 13 A).

45 Los ratones IL6^{h/h} presentaron un claro aumento en el porcentaje de linfocitos B CD27⁺ en el bazo en comparación con los ratones IL6^{m/m} (24,73 % ± 8,94 frente a 9,46 % ± 2,32) pero se encontraron muy pocas células CD27⁺ en la MO (Figuras 14A y 14B).

50 Producción de anticuerpos en ratones RAG2^{-/-}yc^{-/-} injertados con CD34⁺ humano Al igual que se encontraron linfocitos B en los ratones injertados, se midió la concentración de IgM e IgG humanas en plasma recogido a las 12 y 20 semanas del trasplante de células humanas. Tanto los ratones IL6^{m/m} como los IL6^{h/h} secretaron IgM e IgG humanas (Figura 15).

55 En general, se observó un porcentaje más alto de ratones IL6^{h/h} que secretaron anticuerpos en comparación con los ratones IL6^{m/m}, presentando los primeros un menor nivel de nivel de IgM (14,69 mg/ml frente a 33,66 mg/ml a la semana 12 y 18,25 mg/ml frente a 190,2 mg/ml a la semana 20) pero un mayor nivel de IgG (243 mg/ml frente a 49,6 mg/ml a la semana 12 y 553,6 mg/ml frente a 297,2 mg/ml a la semana 20) (Figura 15A). El nivel promedio tanto de IgM como de IgG se elevó a lo largo del tiempo en los ratones IL6^{m/m} (Figura 15B). En cambio, Ig en suero

permaneció constante en los ratones IL6^{h/h}.

Si bien la presente invención se ha divulgado haciendo referencia a realizaciones concretas, las personas especializadas en la técnica podrán apreciar que es posible prever otras realizaciones y variaciones de la presente invención sin por ello alejarse del alcance de la invención, tal como se define con las reivindicaciones adjuntas.

5

REIVINDICACIONES

1. Un roedor genéticamente modificado que comprende:

5 un ácido nucleico que codifica IL-6 humana unido operativamente a un promotor de IL-6, en donde el roedor expresa un polipéptido de IL-6 humana y no expresa un polipéptido de IL-6 funcional nativo, y al menos un ácido nucleico adicional seleccionado del grupo que consiste en:

- 10 i) un ácido nucleico que codifica SIRPa humana unido operativamente a un promotor de SIRPa, en donde el roedor expresa un polipéptido de SIRPa humana;
- ii) un ácido nucleico que codifica M-CSF humano unido operativamente a un promotor de M-CSF, en donde el roedor expresa un polipéptido de MCSF humano;
- 15 iii) un ácido nucleico que codifica IL-3 humana unido operativamente a un promotor de IL-3, en donde el roedor expresa un polipéptido de IL-3 humana;
- iv) un ácido nucleico que codifica GM-CSF humano unido operativamente a un promotor de GM-CSF, en donde el roedor expresa un polipéptido de GMCSF humano; y
- v) un ácido nucleico que codifica TPO humana unido operativamente a un promotor de TPO, en donde el roedor expresa un polipéptido de TPO humana.

20 2. El roedor genéticamente modificado de la reivindicación 1, en el que el promotor de IL-6 es el promotor de IL-6 de roedor y el ácido nucleico que codifica IL-6 humana está unido operativamente al promotor de IL-6 de roedor en el locus de IL-6 de roedor.

3. El roedor genéticamente modificado de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico que codifica M-CSF humano está en el locus de M-CSF del roedor, el ácido nucleico que codifica IL-3 humana está en el locus de IL-3 del roedor, el ácido nucleico que codifica GM-CSF humano está en el locus de GM-CSF del roedor y el ácido nucleico que codifica TPO humana está en el locus de TPO del roedor.

4. El roedor genéticamente modificado de la reivindicación 1 o de la reivindicación 3, en donde el roedor es inmunodeficiente.

5. El roedor genéticamente modificado de la reivindicación 4, en donde el roedor no expresa un gen activador de la recombinación (RAG), cadena gamma del receptor de IL-2 (IL2rg), o tanto RAG como IL2rg.

35 6. El roedor genéticamente modificado de la reivindicación 1, que comprende además un injerto de células hematopoyéticas humanas.

7. El roedor genéticamente modificado de la reivindicación 6, en el que las células hematopoyéticas humanas son células CD34⁺.

40 8. El roedor genéticamente modificado de la reivindicación 6, en el que las células hematopoyéticas humanas son células de mieloma múltiple.

9. El roedor genéticamente modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el roedor es un ratón.

45 10. Un método de generación de un modelo en roedor del desarrollo y el funcionamiento de linfocitos B humanos, comprendiendo dicho método:

50 trasplante de una población de células hematopoyéticas humanas en un roedor genéticamente modificado que es inmunodeficiente y que comprende un ácido nucleico que codifica IL-6 humana unido operativamente a un promotor de IL-6, en donde el roedor expresa un polipéptido de IL-6 humana y no expresa un polipéptido funcional de IL-6 nativo.

11. El método de la reivindicación 10, en el que el promotor de IL-6 es el promotor de IL-6 de roedor y el ácido nucleico que codifica IL-6 humana está unido operativamente al promotor de IL-6 del roedor en el locus de IL-6 del roedor.

12. El método de la reivindicación 10, en el que la población trasplantada de células hematopoyéticas comprende células CD34⁺.

60 13. El método de la reivindicación 10, en el que la población trasplantada de células hematopoyéticas comprende células de mieloma múltiple.

14. El método de la reivindicación 10, en el que el trasplante comprende inyección intrafemoral y/o intratibial.

65 15. El método de la reivindicación 10, en el que el roedor comprende además un ácido nucleico que codifica SIRPa

humana unido operativamente a un promotor de SIRPa, en donde el roedor expresa un polipéptido de SIRPa humana.

5 16. El método de la reivindicación 15, en el que el roedor genéticamente modificado inmunodeficiente expresa al menos un ácido nucleico humano adicional seleccionado del grupo que consiste en:

i) un ácido nucleico que codifica M-CSF humano unido operativamente a un promotor M-CSF, en donde el roedor expresa un polipéptido de M-CSF humano;

10 ii) un ácido nucleico que codifica IL-3 humana unido operativamente a un promotor de IL-3, en donde el roedor expresa un polipéptido de IL-3 humana;

iii) un ácido nucleico que codifica GM-CSF humano unido operativamente a un promotor de GM-CSF, en donde el roedor expresa un polipéptido de GM-CSF humano; y

15 iv) un ácido nucleico que codifica TPO humana unido operativamente a un promotor de TPO, en donde el roedor expresa un polipéptido de TPO humana.

17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10-16, en el que el roedor es un ratón.

20 18. Un método de cribado de un agente candidato en cuanto a la capacidad para tratar un cáncer hematopoyético, comprendiendo dicho método:

poner en contacto un roedor genéticamente modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, al que se han injertado células hematopoyéticas cancerosas humanas, con un agente candidato y

25 comparar la viabilidad y/o la velocidad de proliferación de células hematopoyéticas cancerosas humanas en el roedor con el que se ha entrado en contacto con la viabilidad y/o la velocidad de proliferación de células hematopoyéticas cancerosas humanas en un roedor genéticamente modificado de una cualquiera de las

reivindicaciones 1-9 al que se han injertado células hematopoyéticas cancerosas humanas pero que no se ha puesto en contacto con el agente candidato,

30 en donde un descenso de la viabilidad y/o la velocidad de proliferación de las células hematopoyéticas cancerosas humanas en el roedor con el que se ha entrado en contacto indica que el agente candidato sirve para tratar el cáncer hematopoyético.

19. El método de la reivindicación 18, en el que el cáncer hematopoyético es mieloma múltiple.

35 20. Un roedor genéticamente modificado que comprende:

un ácido nucleico que codifica IL-6 humana unido operativamente a un promotor de IL-6,

en donde el roedor es inmunodeficiente para un sistema inmune endógeno,

en donde el roedor expresa un polipéptido de IL-6 humana y

40 en donde el roedor no expresa un polipéptido de IL-6 funcional nativo.

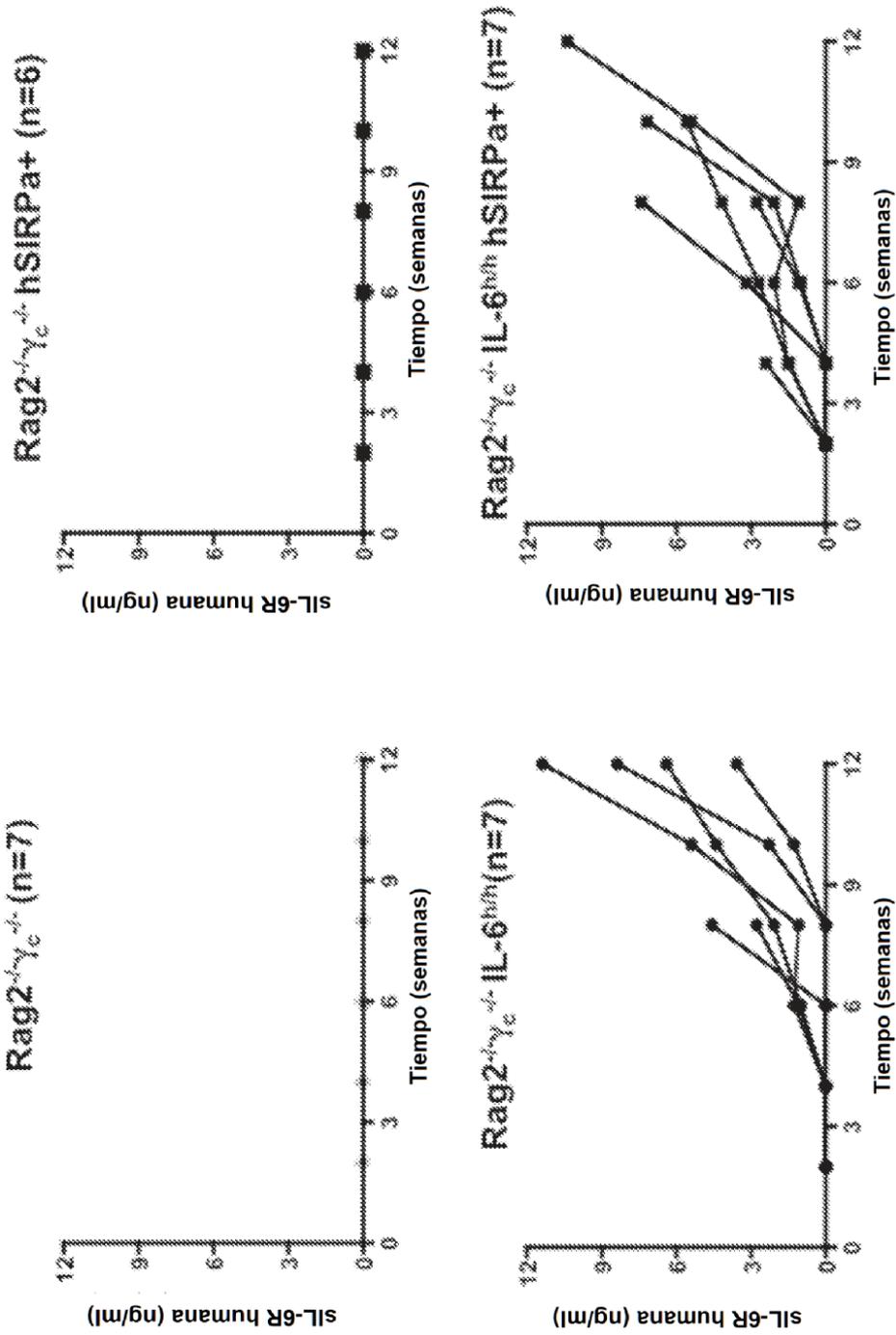


Figura 1

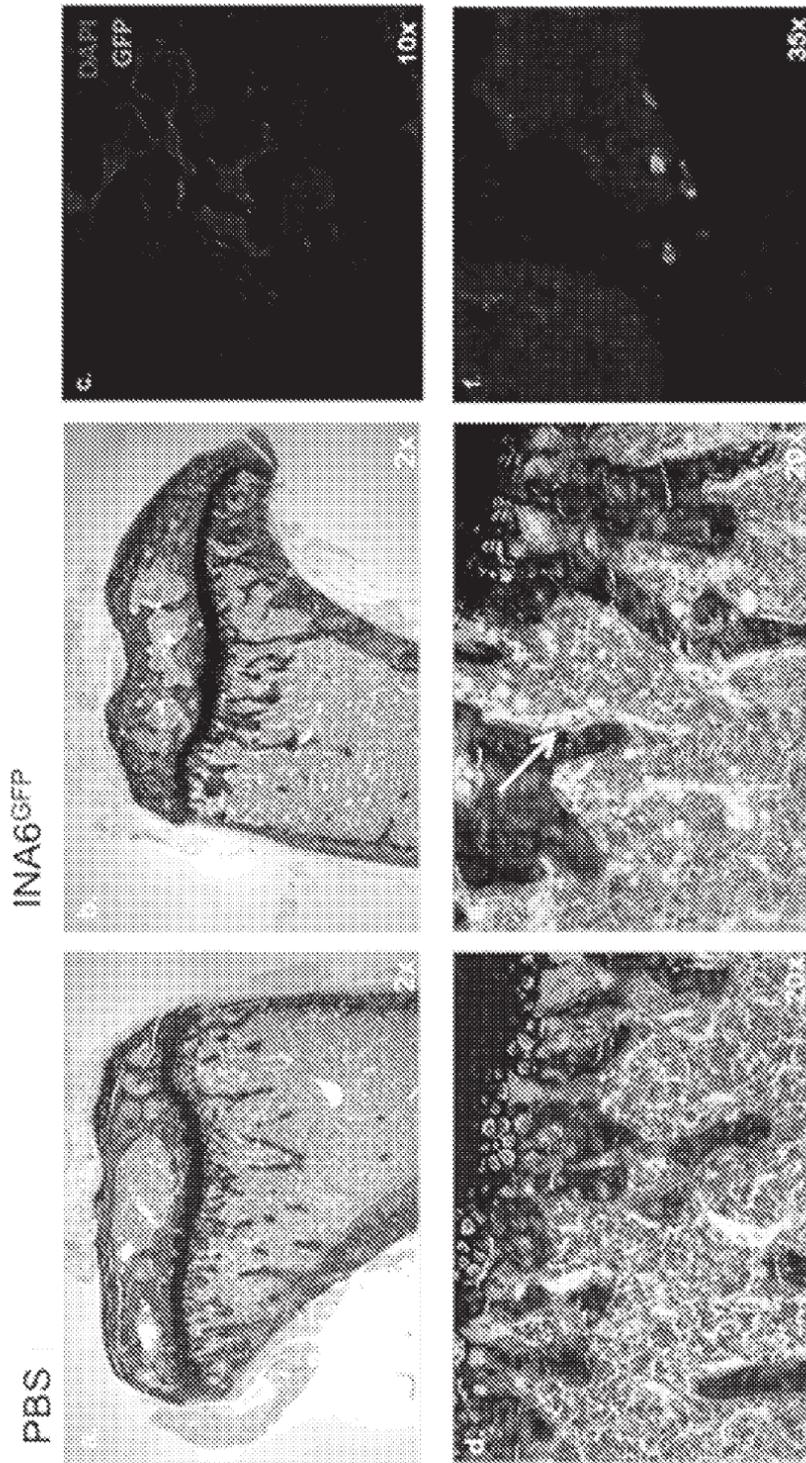


Figura 2

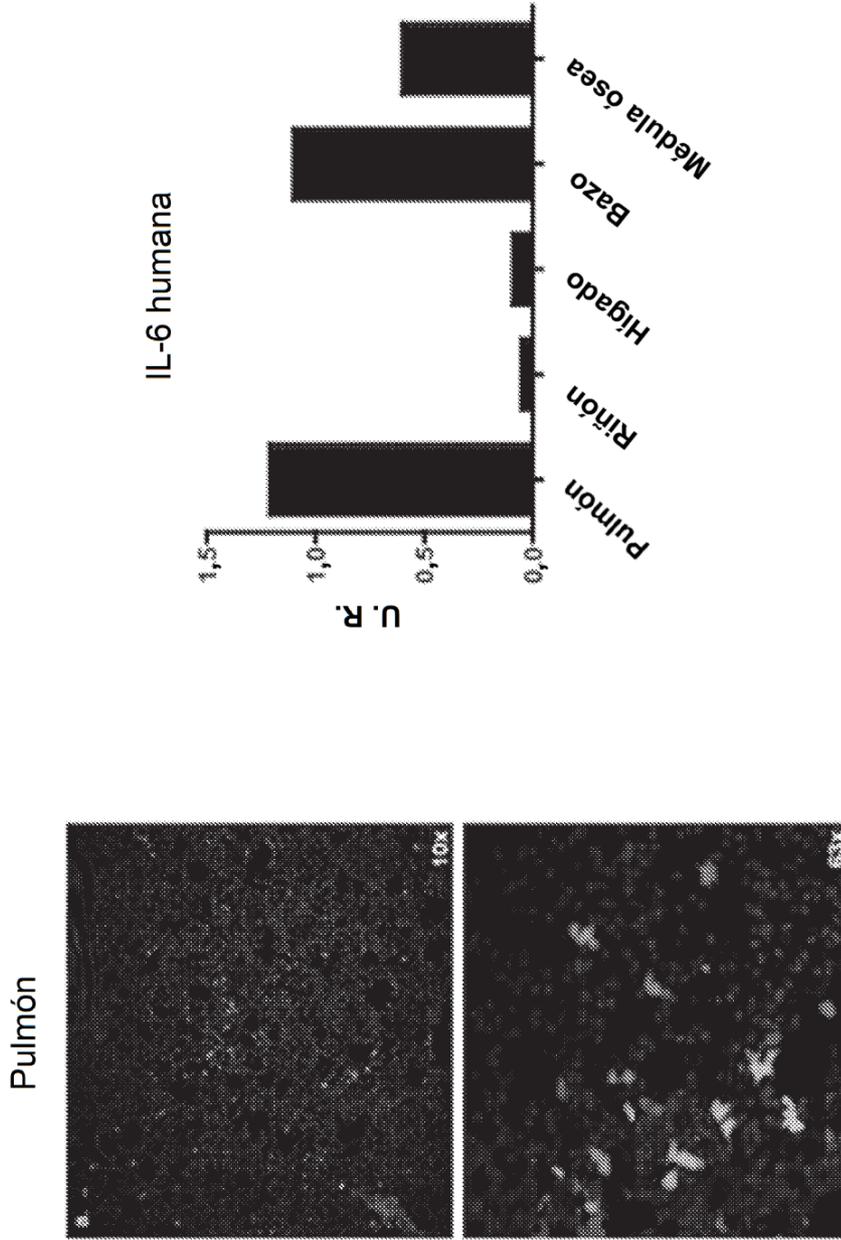


Figura 3

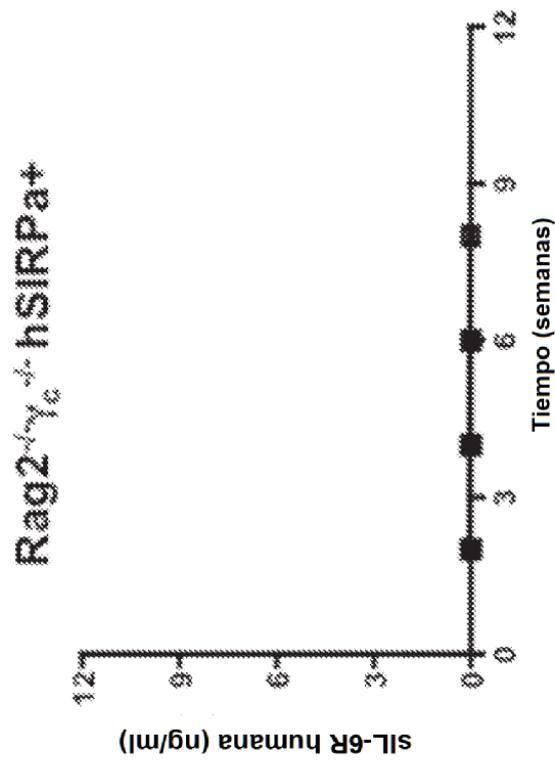
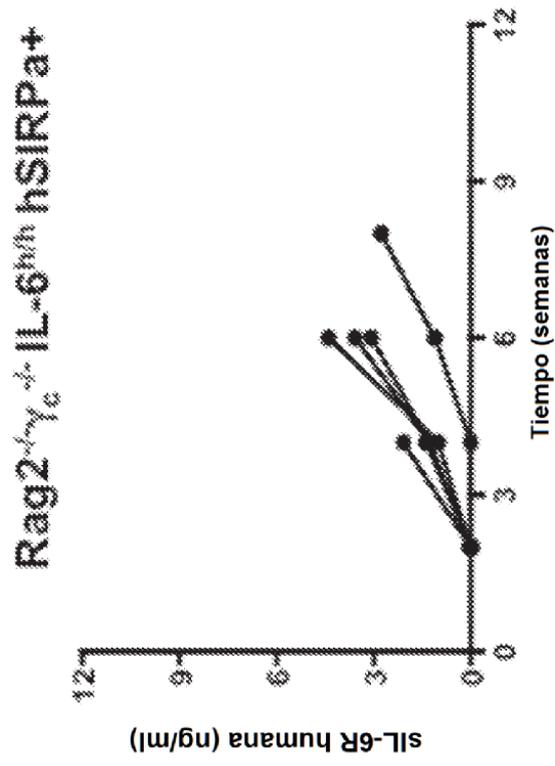


Figura 4

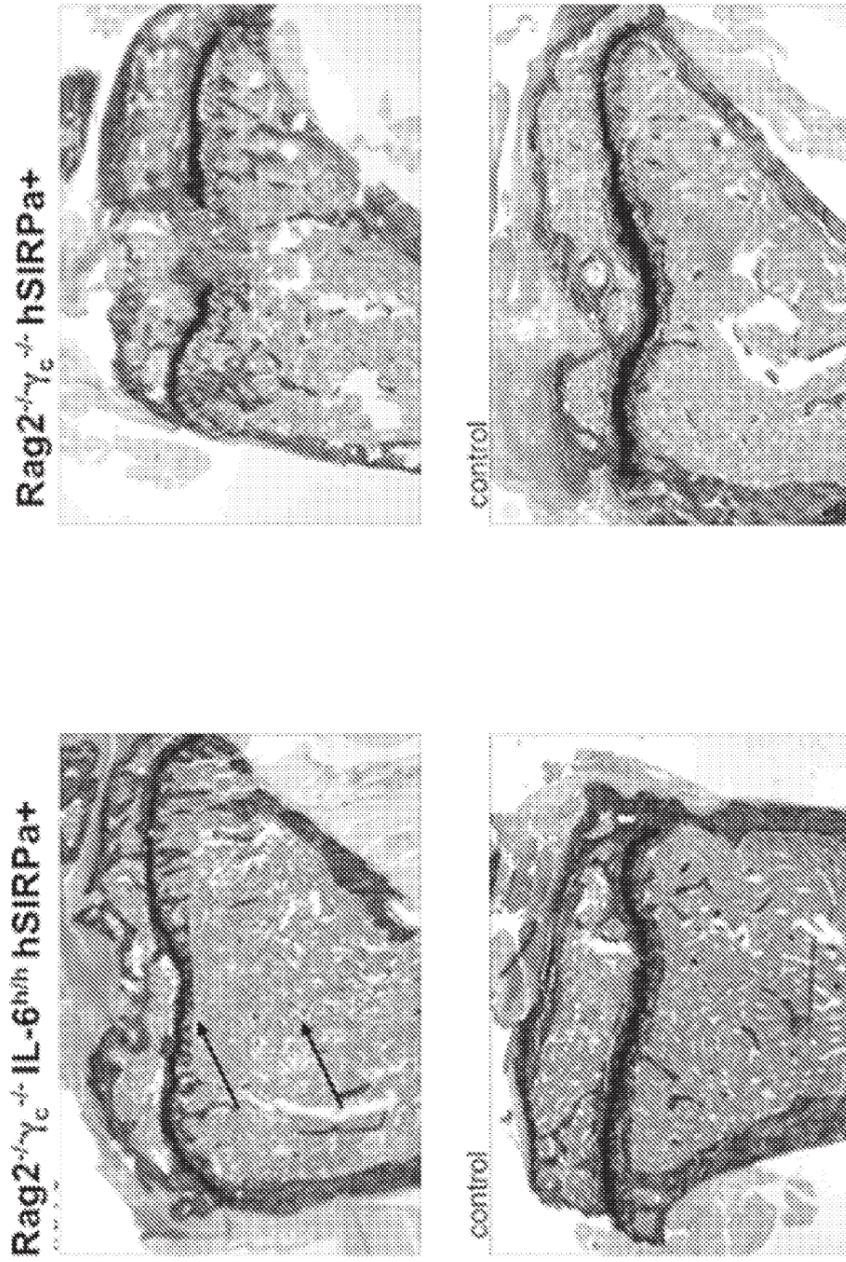


Figure 5

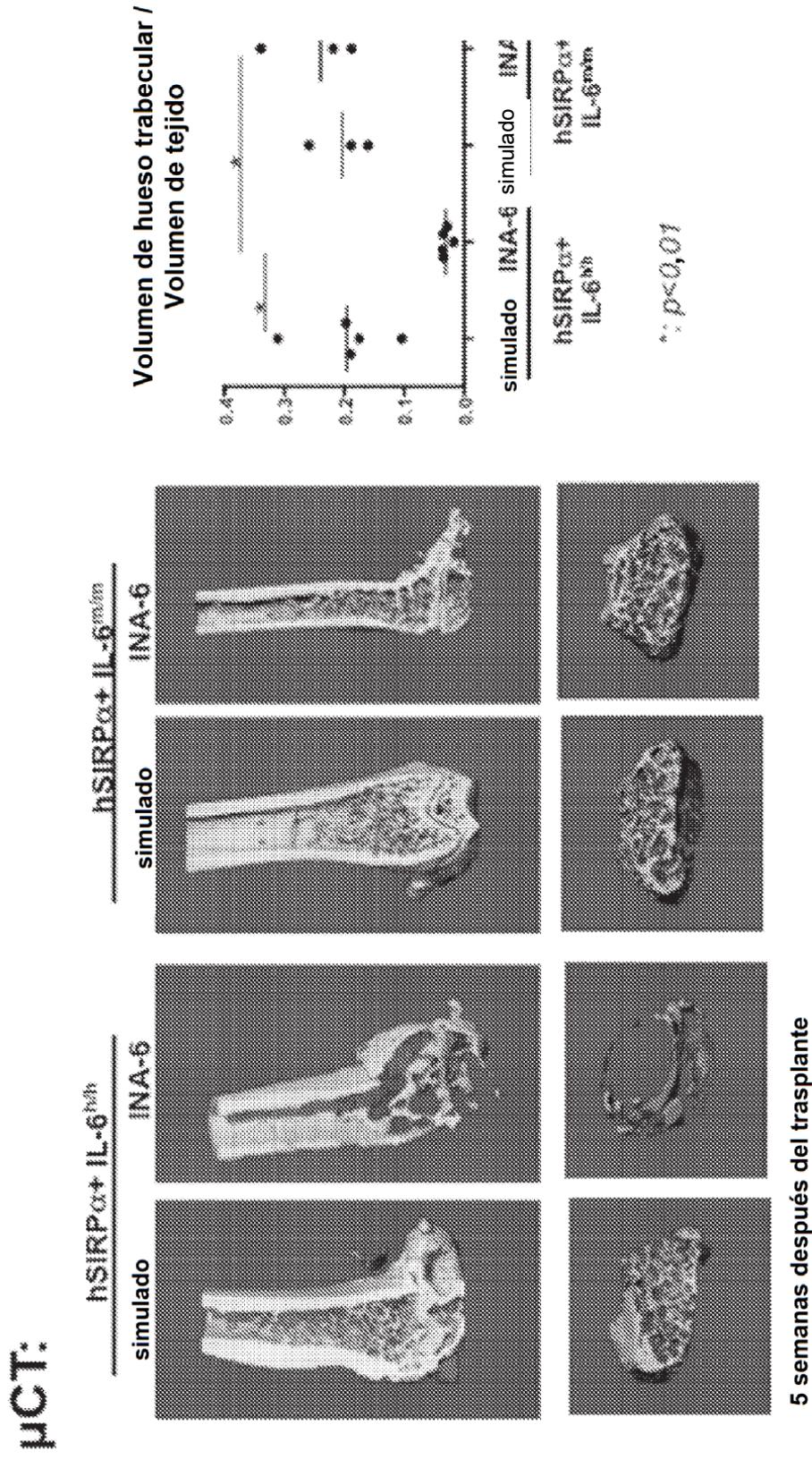


Figura 6

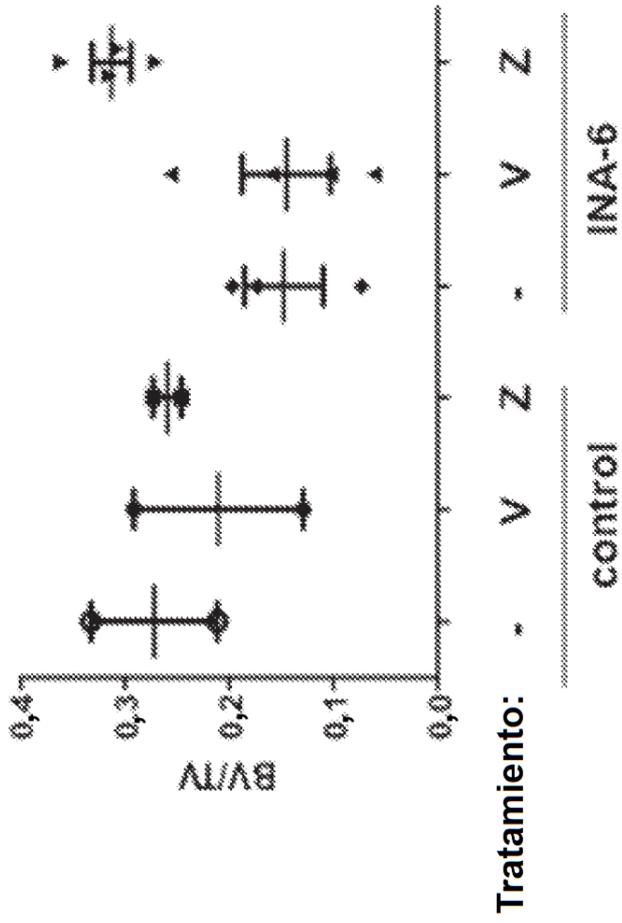


Figura 7

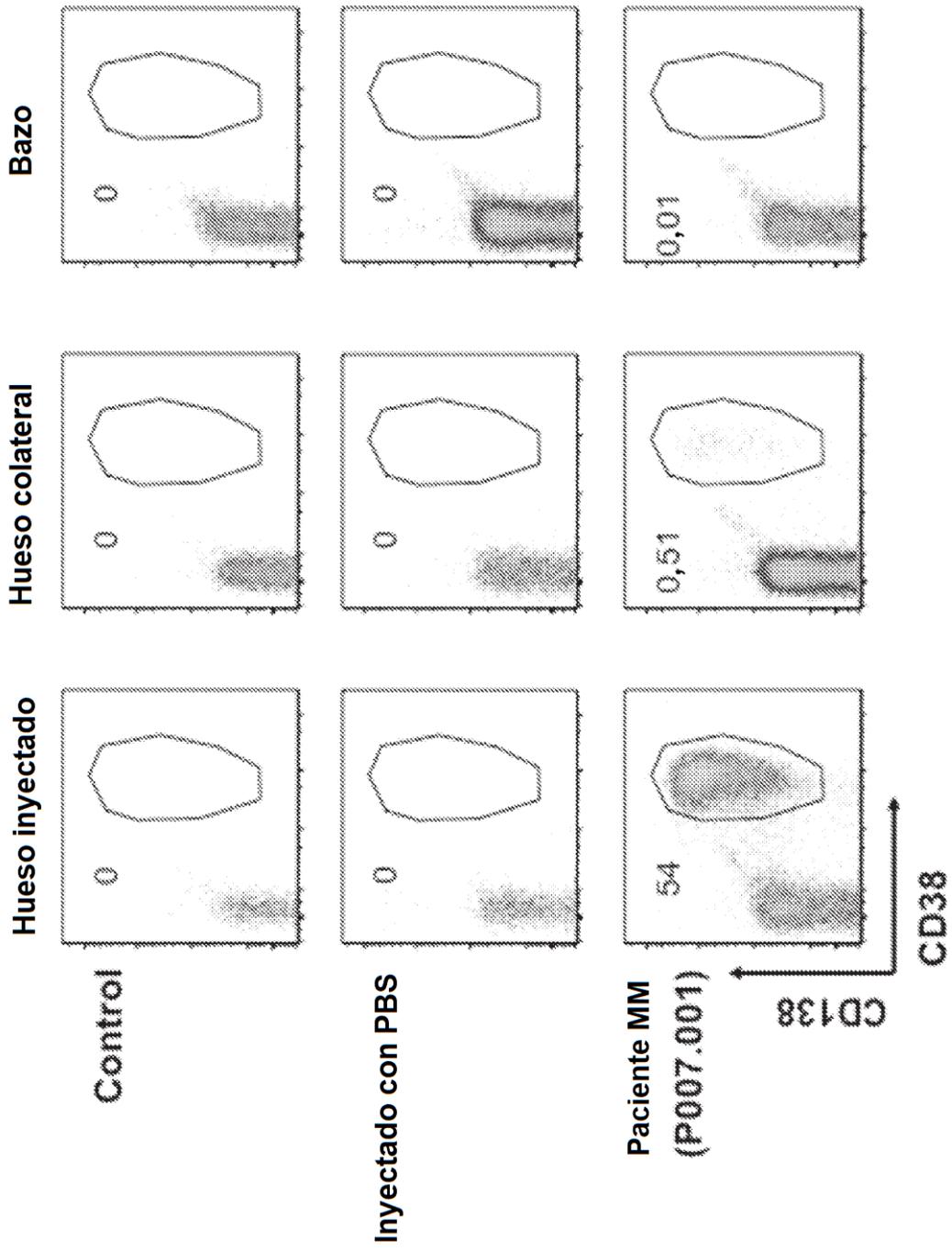


Figura 8

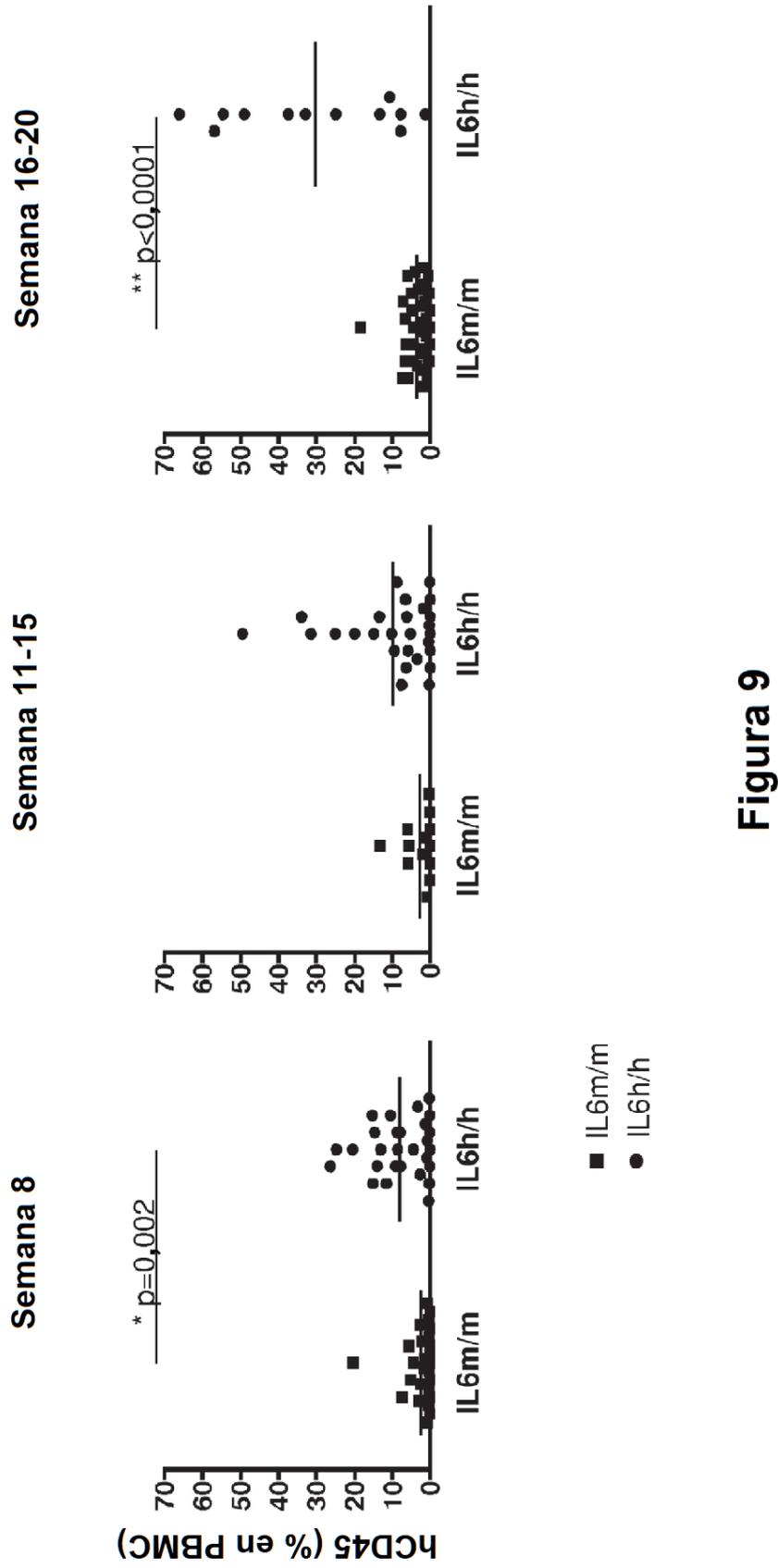


Figura 9

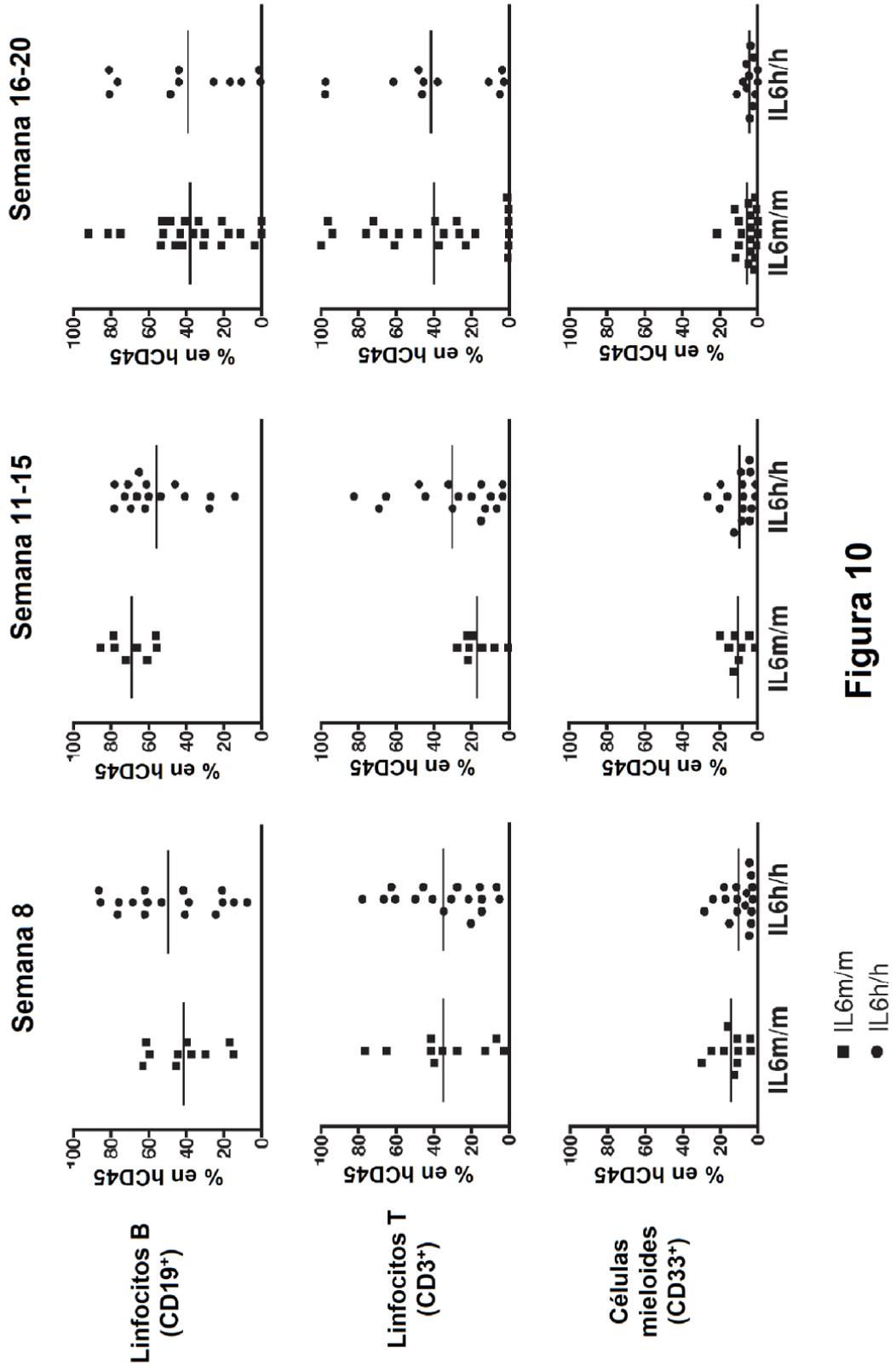


Figura 10

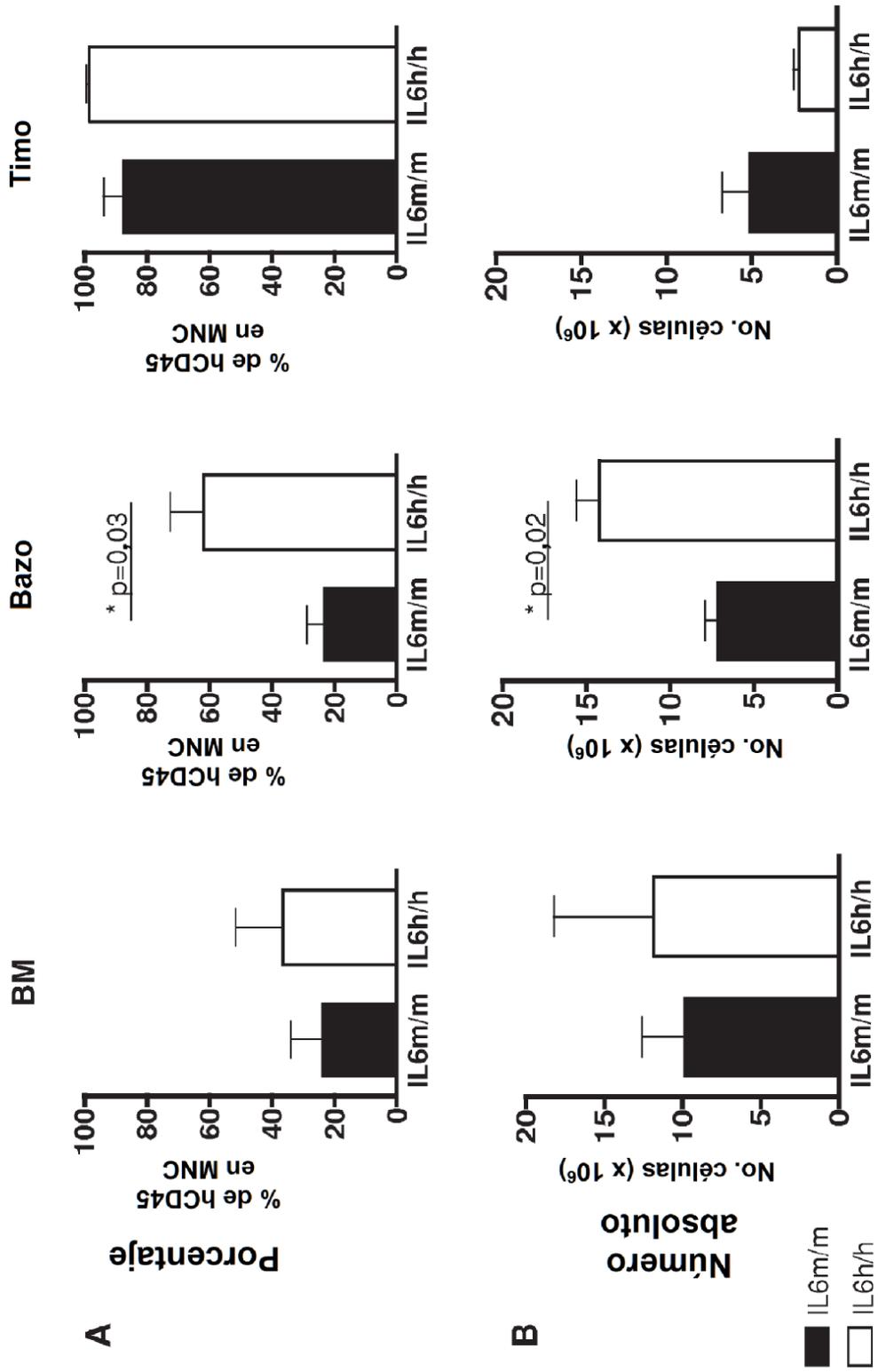


Figura 11

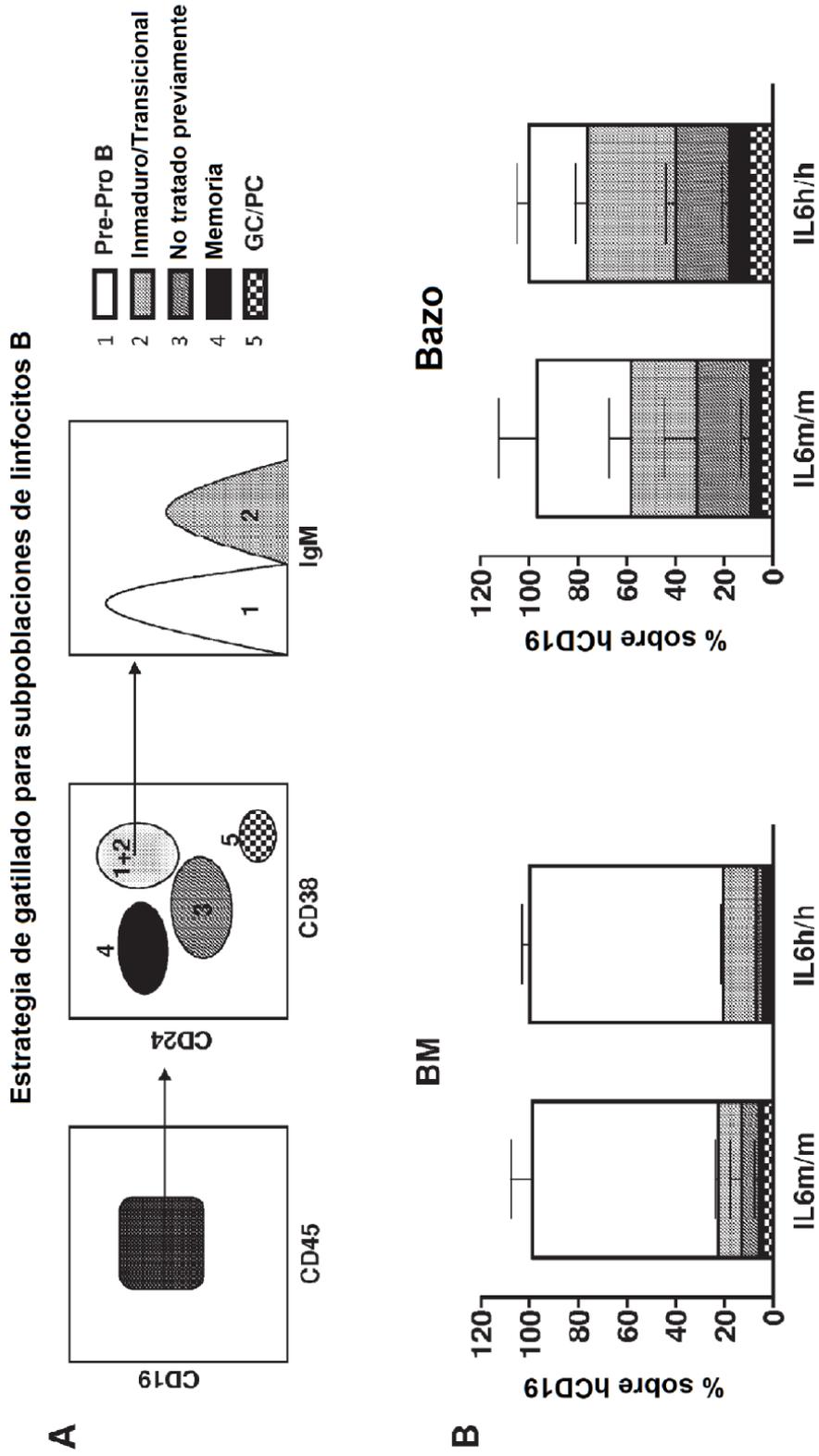


Figura 12

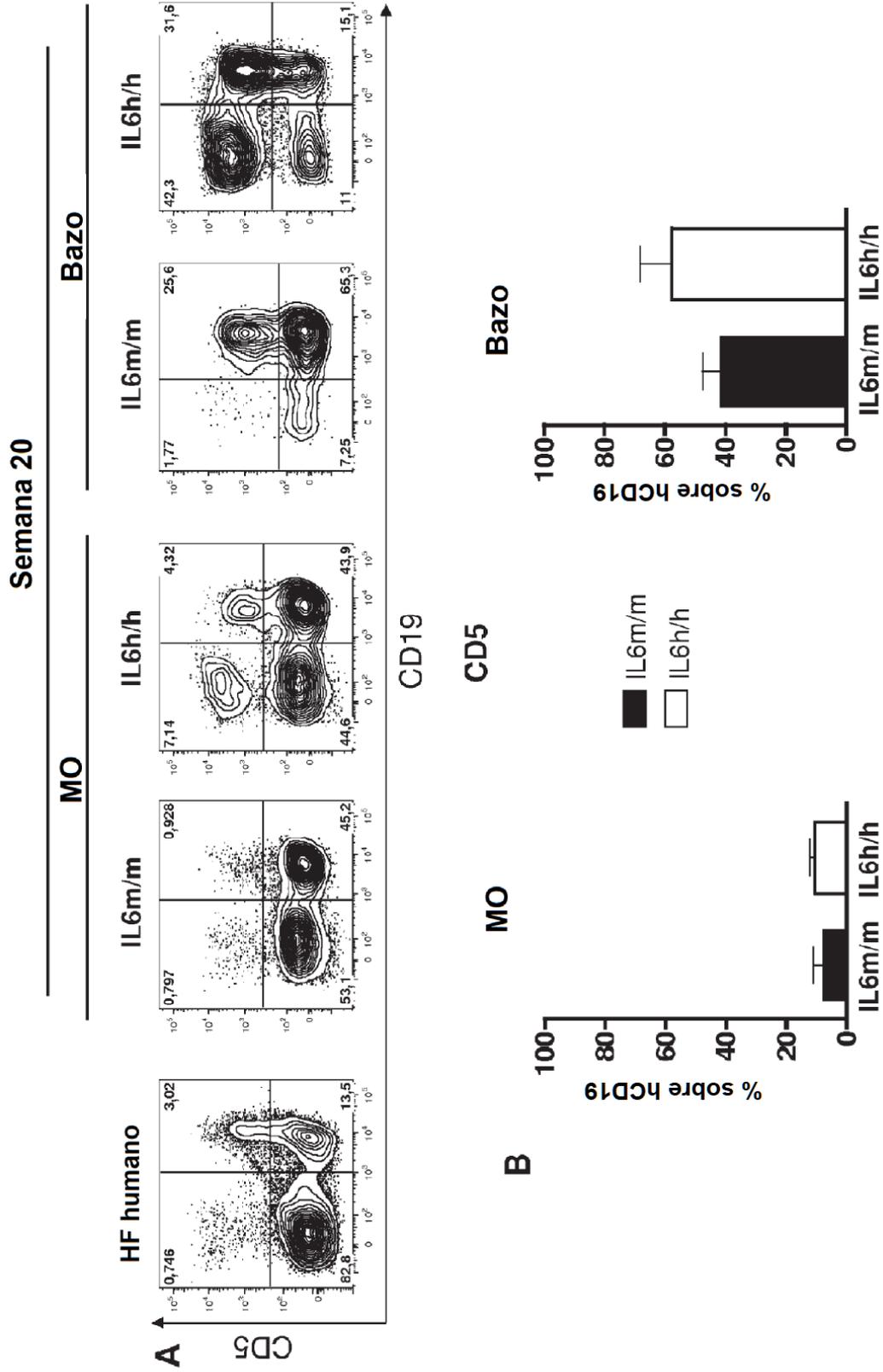
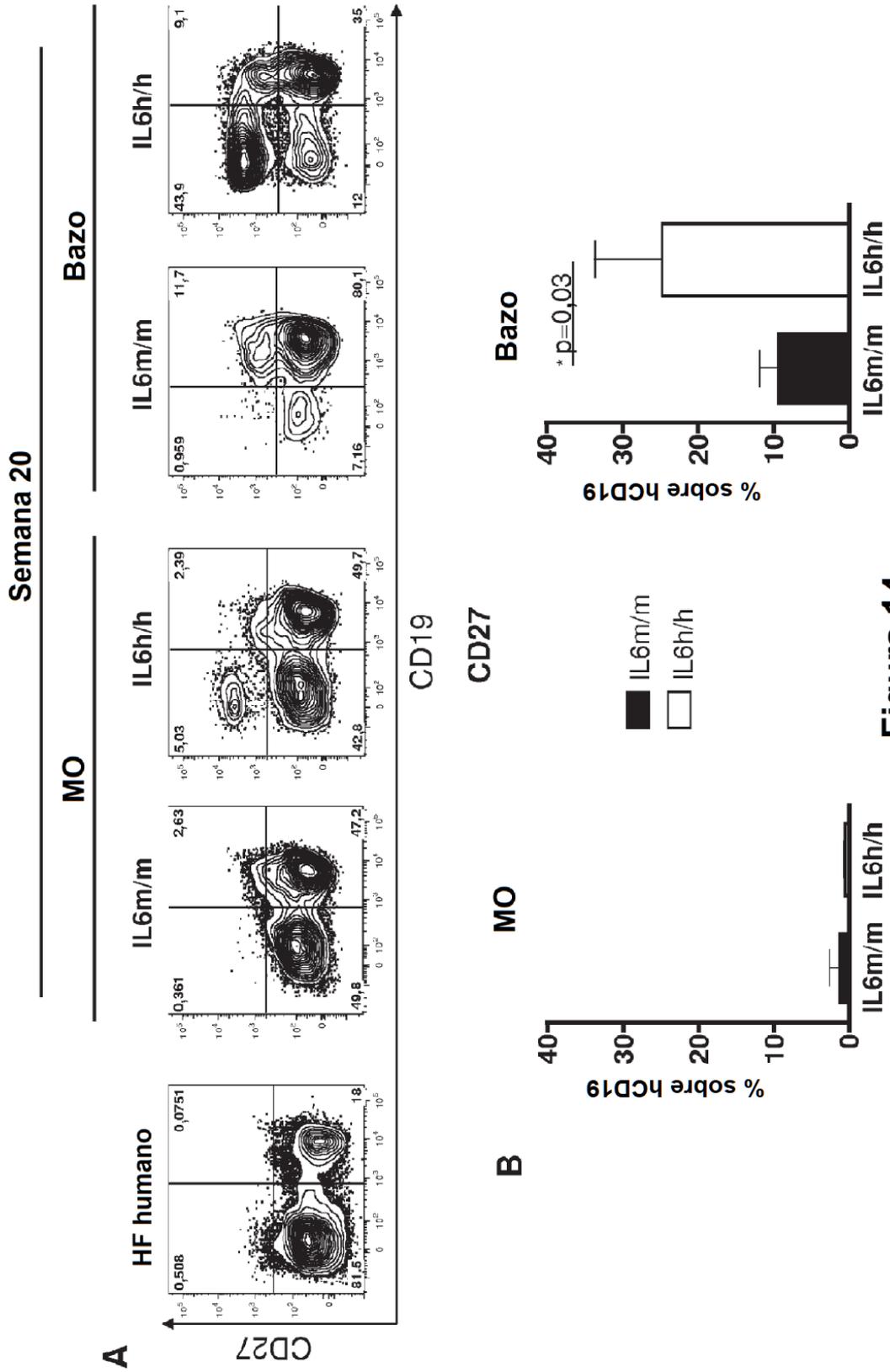
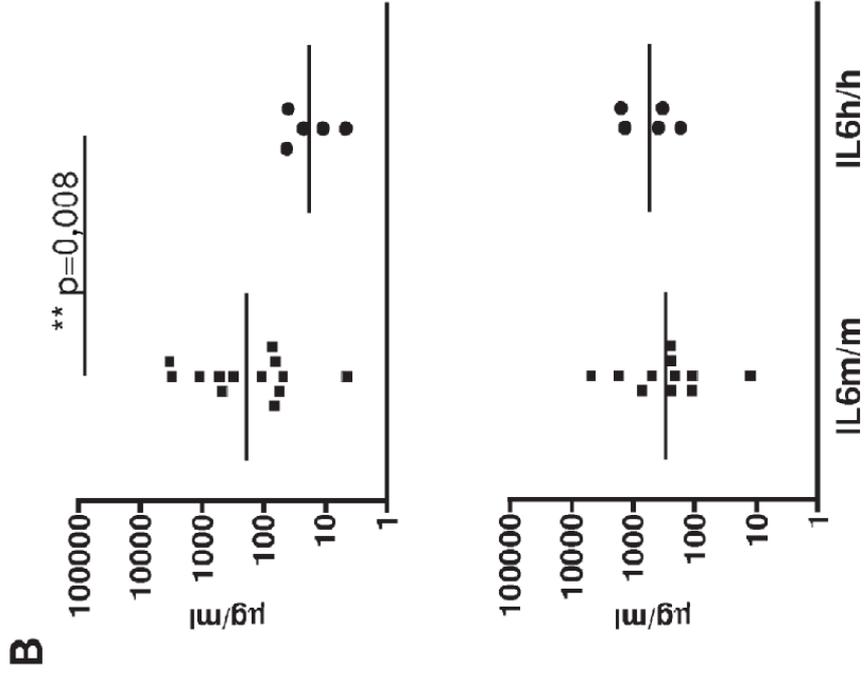


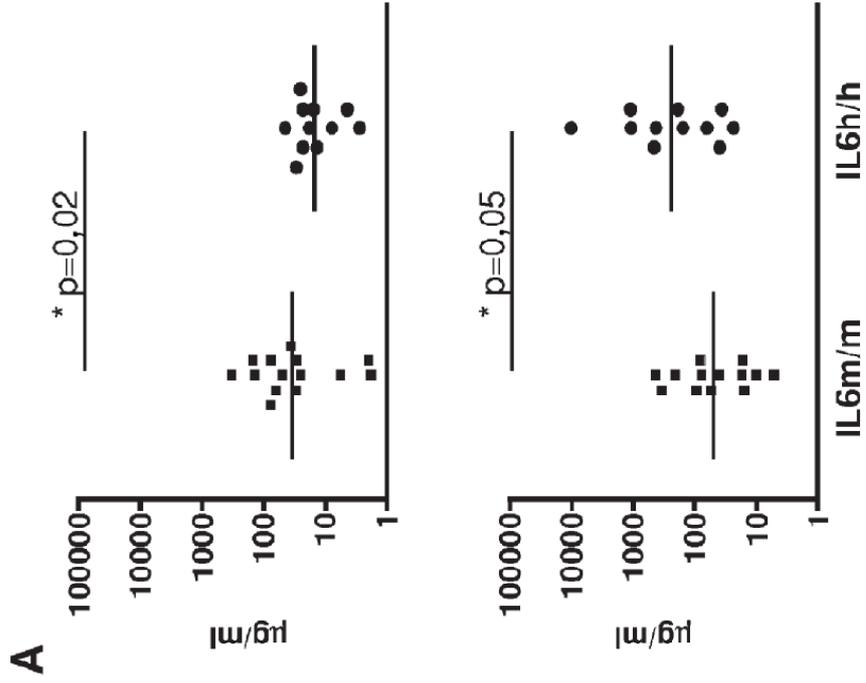
Figura 13



Semana 20



Semana 12



IgM

Intervalo IgM humano:
0,5-4 mg/ml

IgG

Intervalo IgG humano:
5-18 mg/ml

Figura 15