

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 790**

51 Int. Cl.:

**A01K 67/027** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2012 PCT/US2012/025040**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO12112544**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2012 E 12746594 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2675271**

54 Título: **Ratones humanizados con M-CSF**

30 Prioridad:

**15.02.2011 US 201161442946 P**

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

**11.10.2018**

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (33.3%)  
777 Old Saw Mill River Road  
Tarrytown, NY 10591-6707, US;  
YALE UNIVERSITY (33.3%) y  
INSTITUTE FOR RESEARCH IN BIOMEDICINE  
(IRB) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**MURPHY, ANDREW J.;  
STEVENS, SEAN;  
RATHINAM, CHOZHAVENDAN;  
EYNON, ELIZABETH;  
MANZ, MARKUS G.;  
FLAVELL, RICHARD y  
YANCOPOULOS, GEORGE D.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 685 790 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

Ratones humanizados con M-CSF

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a ratones modificados genéticamente que comprenden un gen que codifica una proteína del M-CSF humano y ratones que comprenden modificaciones adicionales que soportan el injerto de células hematopoyéticas humanas.

10

**Antecedentes**

El desarrollo de modelos animales para estudiar enfermedades humanas ha avanzado significativamente en la comprensión de los mecanismos subyacentes de diversas enfermedades, incluyendo el cáncer. Hasta la fecha, modelos animales, particularmente ratones, han demostrado ser excelentes candidatos para la evaluación de la eficiencia y eficacia de fármacos y opciones terapéuticas. Mientras que la utilización de estos modelos sustitutos para estudiar la biología y las enfermedades humanas se puede justificar en gran medida (debido a limitaciones éticas y técnicas en la realización de terapias experimentales en seres humanos) los estudios han puesto de manifiesto posibles limitaciones de extrapolar datos de ratones a seres humanos (Mestas J, Hughes CC. (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 172:2731-2738).

Para superar estos problemas, ha existido un interés permanente en desarrollar modelos de ratones humanizados. El intenso trabajo de diversos grupos ha demostrado con éxito la viabilidad del estudio de la biología y las enfermedades humanas en ratones. Dado que tener un sistema inmune funcional y eficaz en los receptores dará como resultado la eliminación de los tejidos/células trasplantados de origen humano, el uso de mutantes genéticos que carecen de células del sistema inmune adaptativo tales como células T, B y NK ha contribuido significativamente al éxito del modelo murino humanizado. Por consiguiente, los candidatos más eficaces de los modelos de ratón humanizado incluyen las cepas NOD-SCID y Balb/c que carecen de genes que incluyen genes activadores de la recombinación (RAG, del inglés "recombination activating genes"), cadena gamma común ( $\gamma$ C, también conocida como "receptor de interleuquina 2 gamma" o IL2rg), beta 2 microglobulina (B2M) y perforina 1 (Prf1) (Shultz LD, et al. (2007) Humanized mice in translational biomedical research, *Nat. Rev. Immunol.* 7:118-130). Diversos estudios en las últimas décadas han demostrado la viabilidad de trasplantar diversos tipos de tejidos humanos, incluidos leucocitos de sangre periférica, células hepáticas fetales, hueso fetal, timo fetal, ganglios linfáticos fetales, piel vascularizada, segmentos arteriales y células madre hematopoyéticas (CMH) movilizadas o de sangre del cordón umbilical, en ciertos ratones humanizados (Macchiarini F., et al. (2005) Humanized mice: are we there yet? *J. Exp. Med.* 202:1307-1311). Se cree que este enfoque proporciona mejores sistemas de modelos ya que los datos obtenidos de células humanas en estos ratones podrían reflejar la fisiología del sistema humano. Una gran vía de investigación en el campo es la generación de ratones con un sistema hematopoyético completo y un sistema inmune funcional de origen humano. Si bien se ha logrado un progreso significativo en la generación de ratones inmunocomprometidos con linfocitos T, linfocitos B, células NK y células dendríticas (CD), aún existen diversos desafíos en el campo, uno de los cuales es la diferenciación mieloide pobre en los ratones humanizados.

Curiosamente, ha habido mucho progreso en la generación de linfocitos T, linfocitos B, células NK y células dendríticas (CD) humanas a partir de células madre hematopoyéticas (CMH) en ratones humanizados. Además del compartimento hematopoyético individual, la inyección de CMH humanas en estos ratones dio como resultado la reconstitución de órganos linfoides tales como el timo y el bazo. No obstante, las frecuencias de células mieloides, particularmente, granulocitos, macrófagos, eritrocitos y megacariocitos, son muy bajas, un resultado que probablemente se deba a la mielopoyesis ineficaz de las CMH humanas en estos ratones (Shultz *et al.* (2007); Macchiarini *et al.* (2005)). En vista del hecho de que las células de origen mieloide (tales como los eritrocitos y los megacariocitos) son vitales para el funcionamiento normal del sistema sanguíneo y que los granulocitos y los macrófagos son fundamentales para el desarrollo del sistema inmune adaptativo, la generación de ratones humanizados con una mielopoyesis humana eficaz es de suma importancia.

Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de ratones modificados genéticamente que sean capaces de mejorar la mielopoyesis humana tras el injerto con CMH humanas (Manz MG. Human-hemato-lymphoid-system mice: opportunities and challenges. *Immunity.* 2007 May;26(5):537-41). Chen et al., *PNAS*, 106 (51) 21783-21788, 2009 describe un ratón humanizado con M-CSF, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano liberada hidrodinámicamente mediante una inyección en la vena de la cola de un plásmido.

60

**Sumario**

La invención, en su sentido más amplio, es como se define en las reivindicaciones independientes. Se proporcionan ratones modificados genéticamente que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano. También se proporcionan ratones modificados genéticamente que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano que se ha injertado con células humanas tales como

65

- células hematopoyéticas humanas. Estos ratones encuentran utilidad en una serie de aplicaciones, tales como en el modelado de la enfermedad inmune humana y la infección por patógenos; en cribas *in vivo* para agentes que modulan el desarrollo y/o actividad de las células hematopoyéticas, *por ejemplo*, en un estado saludable o enfermo; en cribas *in vivo* para agentes que son tóxicos para las células hematopoyéticas; en cribas *in vivo* para agentes que evitan, mitigan o revierten los efectos tóxicos de agentes tóxicos en las células hematopoyéticas; en cribas *in vivo* de las células hematopoyéticas humanas de un individuo para predecir la capacidad de respuesta de un individuo a una terapia para una enfermedad, *etc.*
- El ratón humanizado con M-CSF comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano operativamente unida al promotor del M-CSF de ratón endógeno en el locus M-CSF de ratón, es decir, el ratón es un ratón *M-CSF<sup>h/m</sup>*. En algunas realizaciones, el ratón comprende dos copias de la secuencia de ácido nucleico. La secuencia de ácido nucleico de ambos alelos se localiza en el genoma del ratón dentro del locus M-CSF de ratón. La secuencia de ácido nucleico de ambos alelos está unida operativamente al promotor del M-CSF de ratón endógeno en el locus M-CSF de ratón, es decir, el ratón es un ratón *M-CSF<sup>h/h</sup>*. En algunas realizaciones, el ratón humanizado con M-CSF comprende una mutación nula en al menos un alelo del M-CSF de ratón. En algunos ejemplos, el ratón humanizado con M-CSF comprende una mutación nula en ambos alelos del M-CSF de ratón. En algunas de dichas realizaciones, la mutación nula es una delección de los exones 2-9 del M-CSF de ratón.
- El ratón expresa el M-CSF humano en la médula ósea, bazo, sangre, hígado, cerebro, pulmón, testículos y riñones. En algunos ejemplos, la cantidad del M-CSF humano expresada es sustancialmente la misma que la cantidad del M-CSF de ratón expresada en un ratón de tipo silvestre. En algunos ejemplos, las células del estroma mesenquimales de médula ósea del ratón humanizado con M-CSF expresan una cantidad del M-CSF humano que es sustancialmente la misma que la cantidad del M-CSF de ratón expresada por células del estroma mesenquimáticas de médula ósea de ratón de tipo silvestre. En algunos ejemplos, el ratón humanizado con M-CSF exhibe una concentración fisiológica del M-CSF en sangre y/o tejido. En algunos ejemplos, el ratón expresa el M-CSF de ratón y el M-CSF humano. En otros ejemplos, el único M-CSF expresado por el ratón es el M-CSF humano.
- En algunas realizaciones de la divulgación, el ratón secreta suficiente M-CSF humano para diferenciar las células madre hematopoyéticas humanas injertadas en monocitos humanos, macrófagos humanos y osteoclastos humanos. En algunas realizaciones, el ratón secreta una cantidad eficaz del M-CSF para estimular el desarrollo de macrófagos humanos a partir de monocitos humanos que resultan de un injerto de células madre hematopoyéticas humanas en el ratón. En algunos ejemplos, el ratón secreta una cantidad eficaz del M-CSF para estimular el desarrollo de una célula madre hematopoyética humana en un monoblasto, un monoblasto en un promonocito humano, un promonocito humano en un monocito humano y un monocito humano en un macrófago humano, en un ratón injertado con células madre hematopoyéticas humanas. En algunos ejemplos, la cantidad eficaz del M-CSF humano secretada en el ratón es sustancialmente la misma cantidad del M-CSF de ratón secretada por un ratón de tipo silvestre para lograr un resultado correspondiente (*por ejemplo*, una cantidad eficaz del M-CSF de ratón para estimular el desarrollo de un macrófago de ratón a partir de un monocito de ratón).
- En algunas realizaciones de la divulgación, el control transcripcional y traduccional del M-CSF humano en el ratón modificado genéticamente es idéntico o sustancialmente idéntico al control transcripcional y traduccional del M-CSF de ratón en un ratón que carece de una modificación de su gen del M-CSF de ratón endógeno.
- En algunas realizaciones de la divulgación, la concentración fisiológica del M-CSF humano en el ratón humanizado con M-CSF resulta de la secreción del M-CSF humano de los mismos tipos de células que secretan el M-CSF de ratón en un ratón de tipo silvestre que tiene un gen del M-CSF de ratón y que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano. En otras palabras, se expresan una o más isoformas del M-CSF en un patrón de desarrollo y tejido específico normal.
- En algunas realizaciones de la divulgación, el ratón expresa una isoforma del M-CSF humano seleccionada a partir del proteoglicano del M-CSF, glicoproteína del M-CSF y M-CSF de superficie celular y una combinación de los mismos. En una realización, el ratón expresa al menos dos de las isoformas en un patrón de desarrollo y tejido específico normal. En una realización específica, el ratón expresa el proteoglicano del CSF-1 humano y la de glicoproteína del M-CSF humano y el M-CSF de superficie celular humano.
- En algunas realizaciones de la divulgación, el ratón comprende macrófagos humanos que no son macrófagos derivados de linfocitos T tímicos. En algunas realizaciones, el ratón comprende macrófagos humanos que exhiben formación de podosomas dependientes del M-CSF estimulada por el M-CSF humano expresado en el ratón.
- En algunas realizaciones, el ratón es homocigoto nulo para Rag2 y para IL2rg y comprende células humanas. En algunas realizaciones, las células humanas son células hematopoyéticas.
- En algunos aspectos de la invención, se proporciona la utilización del ratón humanizado con M-CSF como modelo murino del sistema hematopoyético humano, comprendiendo el modelo murino 2 alelos nulos para Rag2, 2 alelos nulos para IL2rg, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano unida operativamente al promotor del gen del M-CSF de ratón en el locus M-CSF de ratón, y células hematopoyéticas

humanas. En otras palabras, el ratón es un ratón *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup>hM-CSF* injertado, en el que hM-CSF indica que el ratón comprende al menos un ácido nucleico que codifica un gen del M-CSF humano. En algunos ejemplos, el ratón *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado es un ratón de la cepa BALB/c que comprende estas modificaciones genéticas. En algunas realizaciones, el ratón también comprende otras modificaciones genéticas.

5 En algunos ejemplos, el ratón *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado de aproximadamente 12 semanas de edad exhibe una frecuencia aumentada de células CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> humanas (hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>) en la médula ósea, bazo y sangre periférica en comparación con un ratón que comprende células hematopoyéticas humanas que expresan el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano. En un ejemplo específico, el aumento de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> de la médula ósea en un ratón que expresa solo el M-CSF de ratón es aproximadamente de 5 a aproximadamente 15 veces, en un ejemplo aproximadamente de 12 a aproximadamente 14 veces. En una realización específica de la invención, el aumento de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> del bazo en un ratón que comprende células hematopoyéticas humanas que expresa solo el M-CSF de ratón es aproximadamente de 2 a aproximadamente 6 veces, por ejemplo, aproximadamente de 5 a aproximadamente 6 veces. En una realización específica de la invención, el aumento de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> de la sangre periférica en un ratón que comprende células hematopoyéticas humanas que expresa solo el M-CSF de ratón es aproximadamente de 2 a aproximadamente 8 veces, por ejemplo, aproximadamente de 5 a aproximadamente 7 veces.

20 En algunas realizaciones de la divulgación, el ratón *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado de aproximadamente 12 semanas de edad exhibe un nivel de células de linaje monocito/macrófago hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en sangre de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 %, en una realización aproximadamente 30 %. En una realización, el ratón injertado genéticamente modificado de aproximadamente 16 semanas de edad exhibe un nivel de células del linaje monocito/macrófago hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en sangre de aproximadamente 15 a aproximadamente 30%, en una realización aproximadamente 22%. En una realización, el ratón injertado genéticamente modificado de aproximadamente 20 semanas de edad exhibe un nivel de células de linaje monocito/macrófago hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en sangre de aproximadamente 5 a aproximadamente 15%, en una realización aproximadamente 10%. En una realización, el ratón injertado genéticamente modificado de aproximadamente 20 semanas de edad exhibe un nivel de células de linaje monocito/macrófago hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en sangre que es aproximadamente 4 a 8 veces mayor que el nivel en un ratón injertado que expresa el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano, en una realización aproximadamente 6 veces mayor.

35 En algunas realizaciones, el ratón *Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado de aproximadamente 12 semanas de edad exhibe un nivel de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> en el hígado que es aproximadamente 1,5 a aproximadamente 6 veces mayor que un ratón injertado que expresa el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano. En una realización, el ratón injertado genéticamente modificado de aproximadamente 12 semanas de edad exhibe un nivel de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> en el pulmón que es aproximadamente 1,5 a aproximadamente 10 veces mayor que un ratón injertado que expresa el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano. En una realización, el ratón injertado genéticamente modificado de aproximadamente 12 semanas de edad exhibe un nivel de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> humanas en el peritoneo y en la piel que es aproximadamente 2 a aproximadamente 3 veces mayor que un ratón injertado que expresa el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano.

45 En algunas realizaciones, el ratón *Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado exhibe un respuesta a la inyección de LPS que es aproximadamente 1,5 a aproximadamente 6 veces mayor con respecto al porcentaje de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en el hígado que los ratones que carecen del M-CSF humano, en una realización aproximadamente de 2 a aproximadamente 4 veces; en el pulmón la respuesta a LPS con respecto a células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> es aproximadamente de 1,5 a 10 veces, en una realización aproximadamente de 2 a 3 veces; en la piel la respuesta a LPS con respecto a hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> es aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces, en una realización aproximadamente de 3 a aproximadamente 4 veces; en el peritoneo la respuesta a LPS con respecto a hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> es aproximadamente de 2 a aproximadamente 5 veces, en una realización aproximadamente de 3 a aproximadamente 4 veces.

55 En algunas realizaciones, el ratón *Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado exhibe en respuesta a la estimulación con LPS una respuesta mejorada de citoquina proinflamatoria, en la que la mejora en un ratón injertado y genéticamente modificado que carece de un gen del hM-CSF es aproximadamente de 2 a al menos aproximadamente 5 veces con respecto al nivel de activación y/o diferenciación de un tipo celular que es sensible a la citoquina proinflamatoria.

60 En algunas realizaciones, el ratón *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado exhibe una producción mejorada de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>hCD45<sup>+</sup> en el bazo aproximadamente 48 horas después de la inyección con LPS, en el que la mejora es aproximadamente de 2 a aproximadamente 5 veces, en una realización de 4 a aproximadamente 5 veces, en un ratón injertado que expresa el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano.

65 En algunas realizaciones, el ratón *Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado exhibe una producción mejorada de IL-6 humana en suero en respuesta a LPS, en el que el nivel de hIL-6 aproximadamente 6 horas después de la inyección de LPS se mejora aproximadamente de 2 a aproximadamente 5 veces en un ratón injertado que expresa el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano, en una realización aproximadamente de 3 a aproximadamente 4 veces.

- 5 En algunas realizaciones, el ratón *Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado exhibe una producción mejorada del TNF $\alpha$  humano en suero en respuesta a LPS, en el que el nivel de hTNF $\alpha$  aproximadamente 6 horas después de la inyección de LPS se mejora aproximadamente de 2 a aproximadamente 4 veces en un ratón injertado que expresa el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano, en una realización aproximadamente de 2 a aproximadamente 3 veces.
- 10 En algunas realizaciones, un monocito y/o un macrófago aislados a partir del ratón *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado exhibe secreción *in vitro* tras la estimulación con LPS que es aproximadamente de 2 a 3 veces mayor con respecto al hTNF $\alpha$  que un ratón injertado que expresa el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano.
- 15 En algunas realizaciones, un monocito y/o un macrófago aislados a partir del ratón *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado exhibe secreción *in vitro* tras la estimulación con poli I:C que es aproximadamente de 3 a 6 veces mayor con respecto al hINF $\alpha$  que un ratón injertado que expresa el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano.
- 20 En algunas realizaciones, un monocito y/o un macrófago aislados a partir del ratón *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado exhibe secreción *in vitro* tras la estimulación con poli I:C que es aproximadamente de 2 a 3 veces mayor con respecto al hINF $\beta$  que un ratón injertado que expresa el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano.
- 25 En algunas realizaciones, un monocito y/o un macrófago humanos aislados a partir del ratón *Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado exhibe fagocitosis mejorada en comparación con un ratón mejorado que expresa el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano. En una realización, la mejora es aproximadamente el doble de la tasa de fagocitosis, medida mediante la incorporación de bacterias marcadas a 37 °C durante un periodo de tiempo de 60 minutos, en comparación con células humanas de un ratón injertado que expresa el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano. En una realización, la tasa de fagocitosis medida anteriormente es dos veces o más la tasa de células humanas de un ratón injertado que expresa el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano, por ejemplo, 2 veces, 3 veces o 4 veces o más.
- 30 En algunas realizaciones, un monocito y/o un macrófago humanos aislados a partir del ratón *Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado exhibe quimiotaxis mejorada *in vitro* en respuesta a Mip3 $\beta$  en comparación con un ratón injertado que expresa el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano. En una realización, la mejora es aproximadamente de 1,5 veces a 3 veces o más, por ejemplo, aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces o más, medida mediante el número de células migradas a los 30 o 60 minutos después de la exposición a Mip3 $\beta$ , en comparación con un monocito y/o un macrófago humanos de un ratón injertado que expresa el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano.
- 35 En algunas realizaciones, un monocito y/o un macrófago humanos aislados a partir del ratón *Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>-/-</sup> M-CSF<sup>h</sup>* injertado exhibe secreción *in vitro* tras la estimulación con poli I:C que es aproximadamente de 3 a 6 veces mayor con respecto al hINF $\alpha$  que un ratón injertado que expresa el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano.
- 40 En algunas realizaciones, un monocito y/o un macrófago humanos aislados a partir del ratón *Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado exhibe regulación positiva *in vitro* de una molécula coestimuladora en respuesta a la estimulación con LPS. En una realización, la molécula coestimuladora se selecciona de CD40 humano, CD80 humano, CD86 humano, HLA-DR humano y una combinación de las mismas.
- 45 En algunos aspectos de la invención, se proporciona un ratón injertado genéticamente modificado, en el que el ratón comprende un injerto de células hematopoyéticas humanas, *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup>*, comprende un alelo nulo para el M-CSF de ratón y comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un M-CSF humano en el locus M-CSF endógeno, en el que el ratón exhibe una mejora, o número aumentado, de células mieloides humanas en comparación con la que expresa el M-CSF de ratón pero no el M-CSF humano.
- 50 En algunas realizaciones, la mejora comprende al menos una duplicación en el número de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en una porción del ratón seleccionado de la médula ósea, bazo y sangre periférica. En una realización específica, la mejora comprende un triplicado de las células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>. En otra realización, la mejora comprende un aumento de 4 a 5 veces o más en el número de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>.
- 55 En algunas realizaciones, la mejora comprende un aumento de 2 a 3 veces en el número de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>hCD45<sup>+</sup> en un compartimento del ratón seleccionado de la piel y el peritoneo.
- 60 En algunas realizaciones, la mejora comprende un aumento de 1,5 a 10 veces en el número de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>hCD45<sup>+</sup> en un compartimento del ratón seleccionado del hígado y el pulmón.
- 65 En algunas realizaciones, la mejora comprende un aumento de 4 a 5 veces en el número de células

hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>hCD45<sup>+</sup> del bazo aproximadamente 48 horas después de la estimulación con LPS.

En algunas realizaciones, la mejora comprende un aumento de 2 a 4 veces en hIL-6 de suero estimulada con LPS o hTNF $\alpha$  de suero estimulado con LPS.

5 En algunas realizaciones, la mejora comprende un aumento de 2 a 3 veces o más en la migración *in vitro* estimulada con MIP3 $\beta$  humana de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>.

10 En algunos aspectos de la invención, se proporciona la utilización del ratón humanizado con M-CSF como modelo murino para un patógeno humano, comprendiendo el modelo murino 2 alelos nulos para Rag2, 2 alelos nulos para IL2rg, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano unida operativamente al promotor del gen del M-CSF de ratón, células hematopoyéticas humanas y una infección mediante un patógeno humano. En otras palabras, el ratón es un ratón Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF injertado que se ha infectado con un patógeno humano. En algunas realizaciones, el patógeno es un virus, un hongo o una bacteria. En algunos ejemplos, el virus es un virus de la gripe humana o porcina o aviar. En algunos ejemplos, la bacteria es una micobacteria, por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). En algunas realizaciones, la bacteria es una enterobacteria, por ejemplo, *Salmonella typhi* (*S. typhi*).

20 En el presente documento se describe una construcción de direccionamiento para dirigir un gen del M-CSF de ratón que comprende (a) brazos de dirección cadena arriba y cadena abajo que son complementarios o sustancialmente complementarios de secuencias de nucleótidos cadena arriba y cadena abajo de (i) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína del M-CSF de ratón o, (ii) un secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína del M-CSF de ratón; (b) una secuencia de ácido nucleico humana que codifica una proteína del M-CSF humano o un fragmento de la misma o una secuencia de nucleótidos que codifica el complemento de una proteína del M-CSF humano o fragmento de la misma; y, (c) un marcador y/o un casete de selección.

25 En el presente documento se desvela una célula inmune humana de un ratón como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la célula inmune humana se selecciona de un monocito humano o un macrófago humano. En un ejemplo, la célula inmune humana se selecciona de una célula NK humana, un linfocito B humano y un linfocito T humano.

30 En el presente documento se desvela un anticuerpo codificado mediante una secuencia de nucleótidos humana de un ratón como se describe en el presente documento. En un ejemplo, el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo isotipo IgA, IgD, IgE, IgM o IgG.

35 En el presente documento se desvela una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de inmunoglobulinas humanas, en la que la secuencia de nucleótidos se obtiene de un ratón humanizado con M-CSF injertado de acuerdo con la invención. En un ejemplo, la secuencia de nucleótidos codifica una región variable humana de un gen de inmunoglobulinas humanas o un fragmento de la misma. En un ejemplo, la secuencia de nucleótidos codifica una región variable TCR humana o fragmento de la misma.

40 En el presente documento se desvela un método para fabricar un ratón humanizado con M-CSF que expresa el M-CSF humano biológicamente activo. En algunos ejemplos, el método comprende poner en contacto una célula madre pluripotente de ratón, *por ejemplo*, una célula ME o una célula MPi, con una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para una proteína del M-CSF humano o un fragmento de la misma y cultivar la célula madre pluripotente en condiciones que promuevan la integración de la secuencia de ácido nucleico en el genoma del ratón; fabricar un ratón a partir de la célula ME de ratón que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano; y mantener el ratón en condiciones suficientes para que el ratón exprese el M-CSF humano a partir del gen del M-CSF humano. En algunos ejemplos, la secuencia de ácido nucleico se integra aleatoriamente en el genoma. En otros ejemplos, la secuencia de ácido nucleico se integra en un locus diana. En algunos de dichos ejemplos, el locus diana es el locus M-CSF de ratón endógeno, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para una proteína del M-CSF humano está flanqueada por secuencias que son homólogas al locus M-CSF de ratón endógeno y la secuencia de ácido nucleico se integra en el locus M-CSF de ratón endógeno por recombinación homóloga. En algunos ejemplos, el ratón es homocigoto nulo para Rag2. En algunos ejemplos, el ratón es homocigoto nulo para IL2rg. En algunos ejemplos, el ratón es homocigoto nulo para Rag2 y IL2rg, *es decir*, es Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup>.

45 En el presente documento se desvela un método para fabricar un ratón humanizado con M-CSF que comprende un sistema hematopoyético humano. En algunos ejemplos, el método comprende el trasplante en un ratón humanizado con M-CSF, por ejemplo, un ratón Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF o un ratón hM-CSF irradiado subletalmente, una población de células que comprende células progenitoras hematopoyéticas humanas. En algunos ejemplos, las células progenitoras hematopoyéticas humanas son células CD34<sup>+</sup>. En algunos ejemplos, las células progenitoras hematopoyéticas humanas son CD133<sup>+</sup>. En algunos ejemplos, las células progenitoras hematopoyéticas humanas son células madre pluripotentes, por ejemplo, células ME o células MPi. En algunos ejemplos, la fuente de la población de células que comprende células progenitoras hematopoyéticas humanas es el hígado fetal. En algunos

ejemplos, la fuente de las células es la médula ósea. En algunos ejemplos, la fuente de las células es sangre periférica. En algunos ejemplos, la fuente de las células es una población *in vitro* de células.

5 En el presente documento se desvela un método para fabricar un ratón que se infecta con un patógeno humano. En algunos ejemplos, el método comprende la exposición de un humanizado con M-CSF que comprende células hematopoyéticas humanas, por ejemplo, un ratón *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado o un ratón irradiado subletalmente injertado, a un patógeno humano y el mantenimiento del ratón en condiciones suficientes para que el patógeno humano infecte al ratón. En algunos ejemplos, el patógeno humano es un patógeno humano que no infecta un ratón que carece de una o más de las modificaciones genéticas descritas en el presente documento. En algunos ejemplos, 10 el patógeno humano es un patógeno humano que no es patógeno en un ratón que carece de una o más de las modificaciones genéticas descritas en el presente documento.

15 En el presente documento se desvela un método para fabricar el M-CSF humano biológicamente activo en un ratón, comprendiendo el método fabricar un ratón humanizado con M-CSF que expresa el M-CSF humano biológicamente activo como se describe anteriormente y en otra parte en el presente documento. En algunos ejemplos, el método comprende la purificación del M-CSF humano biológicamente activo a partir de sangre, por ejemplo, suero o tejido del ratón. En algunos ejemplos, el método comprende la obtención de una célula que expresa el M-CSF humano biológicamente activo del ratón, el cultivo de la célula en condiciones suficientes para que la célula exprese y secrete el M-CSF humano biológicamente activo y aisle el M-CSF humano biológicamente activo secretado. Se observa que 20 en esta divulgación no se requiere que el ratón tenga otras modificaciones genéticas y que el ratón es útil para preparar ciertas células inmunes humanas. Como tal, en el presente documento se desvela el M-CSF humano biológicamente activo aislado obtenido de un ratón transgénico.

25 En el presente documento se desvela un método para fabricar un monocito humano activado o un macrófago humano activado en un ratón, que comprende la exposición de un ratón humanizado con M-CSF injertado con células hematopoyéticas humanas a un estimulante inmune, que permite que los monocitos o macrófagos humanos en el ratón se activen y aislar de los monocitos humanos o macrófagos humanos de ratón, en donde la fracción de monocitos activados o macrófagos activados es aproximadamente dos veces a cinco veces mayor que la obtenida de un ratón injertado que no es un ratón humanizado con M-CSF, es *decir*, que carece de un gen del M-CSF humano. En algunos ejemplos, el estimulante inmune es una endotoxina. En un ejemplo específico, la endotoxina es LPS. 30

35 En el presente documento se desvela, un método de cribado de un agente candidato para actividad en la modulación de la función de células hematopoyéticas humanas. En algunos ejemplos, el método comprende poner en contacto un ratón humanizado con M-CSF injertado con células hematopoyéticas humanas, por ejemplo, un ratón *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado o un ratón *hM-CSF* irradiado subletalmente injertado, con un agente candidato; y comparar la función de las células hematopoyéticas en el modelo murino en contacto con el agente candidato con la función de las células hematopoyéticas en el modelo murino que no se puso en contacto con el agente candidato; en donde una modulación en la función de las células hematopoyéticas en el ratón en contacto con el agente candidato indica que el agente candidato modula la función de las células hematopoyéticas. 40

45 En el presente documento se desvela un método para determinar el efecto de un agente en un patógeno humano, que comprende la exposición de un ratón humanizado con M-CSF injertado, *por ejemplo*, un ratón *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado o un ratón *hM-CSF* irradiado subletalmente injertado, a una cantidad eficaz de un patógeno humano, siendo la cantidad eficaz de un patógeno la cantidad de patógeno requerida para producir una infección en el ratón; que permite al patógeno infectar al ratón; que mide un parámetro de la infección a lo largo del tiempo en presencia del agente; y que compara esa medida con la medida de un ratón humanizado con M-CSF injertado no expuesto al agente. En algunos ejemplos, el agente se proporciona antes de la exposición del ratón al patógeno humano, por ejemplo, para determinar el efecto protector. En algunos ejemplos, el agente se proporciona simultáneamente con la 50 exposición del ratón al patógeno humano, por ejemplo, para determinar el efecto protector o terapéutico. En algunos ejemplos, el agente se proporciona después de la exposición del ratón al patógeno humano, por ejemplo, para determinar el efecto terapéutico. En algunos ejemplos, el ratón, tras la exposición a un patógeno humano, produce una respuesta inmune celular y/o humoral que modela la infección de un ser humano expuesto al patógeno. En algunos ejemplos, el patógeno humano es un patógeno que no infecta un ratón que carece de una o más de las modificaciones genéticas descritas en el presente documento. En algunos ejemplos, el patógeno humano es un patógeno que infecta un ratón de tipo silvestre, en el que el ratón de tipo silvestre después de la infección no modela una respuesta inmune que un ser humano produce en respuesta al patógeno. En algunos ejemplos, el virus es un virus de la gripe humana o porcina o aviar. En algunos ejemplos, la bacteria es una micobacteria, por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). En algunos ejemplos, la bacteria es una enterobacteria, por ejemplo, 60 *Salmonella typhi* (*S. typhi*). En algunos ejemplos, el ratón se expone a un número conocido de unidades infecciosas del patógeno humano y el parámetro de infección es el número de unidades infecciosas del patógeno humano en un fluido o tejido del ratón. En algunos ejemplos, el parámetro de la infección es un título en un fluido corporal del ratón. En algunos ejemplos, el parámetro de la infección es la formulación de un granuloma. En algunos de dichos ejemplos, el granuloma es un granuloma de pulmón. En algunos de dichos ejemplos, el granuloma es un granuloma bien definido. 65

En el presente documento se desvela un método para determinar el efecto de un agente en un patógeno humano, que comprende la exposición de un ratón humanizado con M-CSF injertado, *por ejemplo*, un ratón *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado o un ratón hM-CSF irradiado subletalmente injertado, a una cantidad eficaz de un antígeno de un patógeno humano, siendo la cantidad eficaz de un antígeno la cantidad de antígeno requerida para producir una respuesta celular y/o humoral en el ratón; que permite desarrollar una respuesta celular y/o humoral; que mide un parámetro de la respuesta celular y/o humoral a lo largo del tiempo en presencia del agente; y que compara esa medida con la medida de un ratón humanizado con M-CSF injertado no expuesto al agente. En algunos ejemplos, se proporciona el agente antes de la exposición del ratón al antígeno del patógeno humano, *por ejemplo*, para determinar el efecto protector del agente. En algunos ejemplos, se proporciona el agente simultáneamente con la exposición del ratón al antígeno del patógeno humano, *por ejemplo*, para determinar el efecto protector o terapéutico del agente. En algunos ejemplos, se proporciona el agente después de la exposición del ratón al antígeno del patógeno humano, *por ejemplo*, para determinar el efecto terapéutico del agente. En algunos ejemplos, el ratón, tras la exposición a un patógeno humano, produce una respuesta inmune celular y/o humoral que modela la infección de un ser humano expuesto al patógeno.

En algunos ejemplos, el antígeno es de un patógeno humano que no infecta un ratón que carece de una o más de las modificaciones genéticas descritas en el presente documento. En otros ejemplos, el antígeno es de un patógeno que infecta un ratón de tipo silvestre, en el que el ratón de tipo silvestre después de la infección no modela una respuesta inmune que un ser humano produce en respuesta al patógeno. En algunos ejemplos, el patógeno es un virus, un hongo o una bacteria. En algunos ejemplos, el virus es un virus de la gripe humana o porcina o aviar. En algunos ejemplos, la bacteria es una micobacteria, *por ejemplo* *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). En algunos ejemplos, la bacteria es una enterobacteria, *por ejemplo*, *Salmonella typhi* (*S. typhi*).

En el presente documento se desvela un método de cribado de un agente candidato para la toxicidad de células hematopoyéticas humanas. En algunos ejemplos, el método comprende poner en contacto un ratón humanizado con M-CSF injertado con células hematopoyéticas humanas, *por ejemplo*, un ratón *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado, con un agente candidato; y comparar la viabilidad y/o función de las células hematopoyéticas en el ratón en contacto con el agente candidato con la viabilidad y/o función de las células hematopoyéticas en un ratón humanizado con M-CSF injertado con células hematopoyéticas humanas que no se puso en contacto con el agente candidato; en donde una disminución en la viabilidad y/o función de las células hematopoyéticas en el ratón en contacto con el agente candidato indica que el agente candidato es tóxico para las células hematopoyéticas.

En el presente documento se desvela un método de cribado de un agente candidato para la capacidad de proteger de células hematopoyéticas humanas de un agente tóxico, mitigar los efectos de un agente tóxico en células hematopoyéticas humanas o invertir los efectos de un agente tóxico en células hematopoyéticas humanas. En algunos ejemplos, el método comprende poner en contacto un ratón humanizado con M-CSF injertado con células hematopoyéticas humanas, *por ejemplo*, un ratón *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado o un ratón hM-CSF irradiado subletalmente injertado, con un agente tóxico; poner en contacto el ratón con un agente candidato; y comparar la viabilidad y/o función de las células hematopoyéticas en el ratón en contacto con el agente candidato con la viabilidad y/o función de células hematopoyéticas en un ratón humanizado con M-CSF injertado con células hematopoyéticas humanas que no se pusieron en contacto con el agente candidato; en donde una mejora en la viabilidad y/o función de las células hematopoyéticas en el modelo murino en contacto con el agente candidato indica que el agente candidato protege las células hematopoyéticas del agente tóxico.

En el presente documento se desvela un método para predecir la capacidad de respuesta de un individuo al tratamiento con un agente terapéutico. En algunos ejemplos, el método comprende poner en contacto un ratón humanizado con M-CSF injertado con células hematopoyéticas humanas del individuo, *por ejemplo*, un ratón *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado o un ratón hM-CSF irradiado subletalmente injertado, con un agente terapéutico; y comparar la viabilidad y/o función de las células hematopoyéticas en el modelo murino en contacto con el agente candidato con la viabilidad y/o función de las células hematopoyéticas en un ratón humanizado con M-CSF injertado con células hematopoyéticas humanas que no se puso en contacto con el agente candidato; en donde una modulación en la viabilidad y/o función de las células hematopoyéticas en el ratón en contacto con el agente candidato indica que el individuo tendrá una respuesta al tratamiento con el agente terapéutico.

## Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** ilustra, para células del estroma mesenquimales de médula ósea, **(A)** la expresión del M-CSF; se aislaron los órganos indicados de M-CSF<sup>m/m</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup>, se extrajo el ARN y se realizó análisis de PCR de transcripción inversa (TI) utilizando cebadores específicos del M-CSF de ratón (superior) o M-CSF humano (medio); se utilizó el nivel de HPRT (inferior) como control para el ADNc de entrada; los datos son representativos de 2 experimentos independientes. **(B)** Se aislaron los órganos indicados de M-CSF<sup>h/m</sup>, se extrajo el ARN y se realizó análisis de TI-PCR utilizando cebadores específicos del M-CSF de ratón (superior) o M-CSF humano (inferior). El ARN extraído del hígado de ratón o del hígado fetal humano sirvió como controles positivos para pares de cebadores de ratón y humanos, respectivamente, sin TI y las reacciones de PCR sin plantilla sirvieron como controles negativos. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes. **(C)** Se aislaron y cultivaron *in vitro* durante 10 días células del estroma asociadas al hueso de ratones M-CSF<sup>m/m</sup>,



M-CSF<sup>m/h</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup>, se lisaron las células y se extrajo el ARN y se realizó análisis de PCR en tiempo real utilizando cebadores específicos del M-CSF de ratón (blanco) o M-CSF humano (negro); se muestran los valores medios de las muestras duplicadas; las barras de error indican  $\pm$  EEM; la cantidad de ADNc de entrada se normalizó de acuerdo con los niveles de expresión de HPRT (hipoxantina guanina fosforribosil transferasa); los datos son representativos de 2 experimentos independientes; y, **(D)** se aislaron y cultivaron *in vitro* durante 10 días células del estroma asociadas al hueso de ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, M-CSF<sup>m/h</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup>; se recogieron los sobrenadantes del cultivo celular y se cuantificaron los niveles secretados del M-CSF de ratón (blanco) y humano (negro) utilizando kits ELISA del M-CSF específicos de especie; se muestran los valores medios de las muestras triplicadas; las barras de error indican  $\pm$  EEM; los datos son representativos de 2 experimentos independientes.

**(E)** Se sangraron ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, M-CSF<sup>h/m</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup> y se cuantificaron los niveles séricos del M-CSF humano y de ratón a través de ELISA. Se muestran los valores medios de las muestras por triplicado. Las barras de error indican  $\pm$  EEM.

La **Figura 2A** ilustra números absolutos de células de médula ósea (MO) de ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, M-CSF<sup>m/h</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup>, como promedio por animal (dos tibia y peroné); cada grupo contiene n = 5 ratones, de 4 semanas de edad; las barras de error indican  $\pm$  EEM; los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

La **Figura 2B** ilustra el análisis de citometría de flujo de una suspensión de células individuales teñidas de MO (superior), bazo (central) y sangre periférica (SP) de ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, M-CSF<sup>m/h</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup>; teñidos con anticuerpos Gr1 y CD11b.

La **Figura 2C** ilustra el análisis de citometría de flujo de una suspensión de células individuales teñidas de MO (superior) y bazo (central) de ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, M-CSF<sup>m/h</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup>; teñidos con anticuerpos F4/80 y CD11b.

La **Figura 2D** ilustra el análisis de citometría de flujo de células de MO que se aislaron y cultivaron en presencia del M-CSF de ratón (izquierda) o M-CSF humano (derecha) recombinante durante 7 días; se teñieron las células con anticuerpos F4/80 y CD11b.

La **Figura 2E** ilustra el análisis de citometría de flujo de células de MO que se aislaron y cultivaron en presencia del M-CSF de ratón (relleno) o M-CSF humano (abierto) recombinante durante 7 días; se teñieron las células con los marcadores de superficie indicados.

La **Figura 3A** ilustra la citometría de flujo de suspensiones de células individuales teñidas de MO (superior), bazo (central) y sangre peritoneal (SP) de células CD34<sup>+</sup> humanas injertadas en ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, M-CSF<sup>m/h</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup>; se teñen con anticuerpos humanos CD45, CD14 y CD33; las células que son CD45<sup>+</sup> humanas se bloquearon previamente y se discriminaron basándose en la expresión de CD14 y CD33.

La **Figura 3B** ilustra frecuencias relativas de células CD45<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> humanas de MO (arriba), bazo (central) y sangre periférica (SP); se determinó el número absoluto de células de MO como promedio por animal (dos tibias y peroné) y de la sangre peritoneal se determinó por ml de volumen de sangre; cada grupo contiene n = 20 ratones; cada símbolo representa un ratón individual, las barras horizontales indican los valores medios; los datos son representativos de 5 experimentos independientes

La **Figura 3C** ilustra frecuencias absolutas de células CD45<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> humanas de MO (arriba), bazo (central) y sangre periférica (SP); se determinó el número absoluto de células de MO como promedio por animal (dos tibias y peroné) y de la sangre peritoneal se determinó por ml de volumen de sangre; cada grupo contiene n = 20 ratones; cada símbolo representa un ratón individual, las barras horizontales indican los valores medios; los datos son representativos de 5 experimentos independientes.

La **Figura 4A** ilustra el análisis de citometría de flujo de células teñidas a partir de células CD34<sup>+</sup> humanas injertadas en ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, M-CSF<sup>m/h</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup> sangrados después de 12, 16 y 20 semanas del trasplante; las células se teñieron con anticuerpos CD45, CD14 y CD33 humanos; las células que son CD45<sup>+</sup> humanas se bloquearon previamente y se discriminaron basándose en la expresión de CD14 y CD33.

La **Figura 4B** ilustra frecuencias relativas de células CD45<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> humanas; cada grupo contiene n = 10 ratones; cada símbolo representa un ratón individual, las barras horizontales indican los valores medios; los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

La **Figura 5** ilustra el análisis de citometría de flujo que resulta de ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, M-CSF<sup>m/h</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup> injertados con células CD34<sup>+</sup> humanas y 12 semanas después del trasplante, cuando se sacrificaron los ratones y se perfusieron con PBS; se recogieron el hígado **(A)**, los pulmones **(B)** y la piel **(C)** y se prepararon suspensiones de células individuales; se recogieron células de la cavidad peritoneal **(D)** mediante aspiración con PBS; se teñieron las células con anticuerpos CD45, CD14 y CD33 humanos y se analizaron mediante citometría de flujo; cada símbolo representa un ratón individual, las barras horizontales indican los valores medios; los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

La **Figura 6** ilustra los resultados de la estimulación con LPS. **(A)** Se injertaron ratones M-CSF<sup>m/m</sup> y M-CSF<sup>m/h</sup> con células CD34<sup>+</sup> humanas y 12 semanas después del trasplante, se inyectó LPS i.p. y 48 horas más tarde se sacrificaron los ratones y se determinaron las frecuencias de células CD45<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> humanas en el bazo; los ratones inyectados con PBS sirvieron como controles; cada símbolo representa un ratón individual, las barras horizontales indican los valores medios. **(B)**, **(C)** Se injertaron ratones M-CSF<sup>m/m</sup> y M-CSF<sup>m/h</sup> con células CD34<sup>+</sup> humanas y 12 semanas después del trasplante, se inyectó LPS i.p. Seis horas después, se sangraron los ratones y se cuantificaron los niveles de suero de IL-6 y TNF- $\alpha$  humano (derecha) y de ratón (izquierda) mediante ELISA; los ratones inyectados con PBS sirvieron como controles; se muestran los valores medios de las muestras triplicadas; las barras de error indican  $\pm$  EEM.

La **Figura 7A** (para hTNF $\alpha$ ) y **7B** (para hIL-6) ilustran la capacidad de los monocitos/macrófagos para secretar *in vitro* citoquinas proinflamatorias después de la estimulación con LPS. Se aislaron las células CD45<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> humanas de los bazos de ratones M-CSF<sup>m/m</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup> injertados en células CD34<sup>+</sup> humanas después de 12

semanas del trasplante; las células CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> obtenidas del hígado fetal sirvieron como controles; se estimularon las células *in vitro* con LPS durante 24 y 48 horas, se recogieron los sobrenadantes del cultivo celular y se cuantificaron los niveles de TNF- $\alpha$  (**A**) e IL-6 (**B**) humanos mediante ELISA; se muestran los valores medios de las muestras triplicadas; las barras de error indican  $\pm$  EEM.

5 La **Figura 7C** ilustra los niveles de ARNm del interferón- $\alpha$  y - $\beta$  en respuesta a la estimulación con poli I:C. Se estimularon las células CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> humanas con poli I:C durante 6 y 12 horas y se cuantificaron los niveles de ARNm de IFN $\alpha$  (izquierda) e IFN $\beta$  (derecha) mediante PCR en tiempo real; se muestran los valores medios de las muestras duplicadas; las barras de error indican  $\pm$  EEM

10 La **Figura 7D** ilustra propiedades de fagocitosis, migración y activación de células de ratones injertados. Se aislaron las células CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> humanas a partir de ratones humanizados y se incubaron con bacterias marcadas con FITC a 37 °C durante 30 y 60 minutos y se midió mediante citometría de flujo; las células incubadas con bacterias marcadas con FITC en hielo sirvieron como controles. Los histogramas abiertos representan células de ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, los histogramas punteados representan células de ratones M-CSF<sup>h/h</sup> y los histogramas rellenos representan células de hígado fetal humano.

15 La **Figura 7E** ilustra la quimiotaxis de células en respuesta a MIP3 $\beta$ . Las células CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> humanas aisladas a partir de ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, ratones M-CSF<sup>h/h</sup> e hígado fetal humano se mantuvieron en los pocillos superiores y se añadió medio que contenía MIP3 $\beta$  en los pocillos inferiores; se incubaron las células durante 30 o 60 minutos y se calculó y representó el número de células que migraron de los pocillos superiores a los pocillos inferiores; se muestran los valores medios de las muestras duplicadas; las barras de error indican  $\pm$  EEM

20 La **Figura 7F** ilustra la activación mejorada de monocitos/macrófagos humanos de ratones injertados basándose en la regulación positiva de hCD40, hCD80, hCD86y hHLA-DR después de la estimulación *in vitro* con LPS. Las células CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> humanas aisladas a partir de ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, ratones M-CSF<sup>h/h</sup> e hígado fetal humano se cultivaron en presencia o en ausencia de LPS; después de 24 horas de la estimulación, se tiñeron las células con los marcadores de superficie indicados y se midieron mediante citometría de flujo. Los histogramas abiertos representan células de ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, los histogramas punteados representan células de ratones M-CSF<sup>h/h</sup> y los histogramas rellenos representan células de hígado fetal humano.

25 La **Figura 8** proporciona una representación esquemática del locus M-CSF de ratón que indica la localización relativa de los exones 1-9 y el alelo diana final con el gen del M-CSF humano.

30 Las **Figuras 9 A, B** ilustran las frecuencias del compartimento de CMH y el compartimento progenitor mielóide en ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, M-CSF<sup>h/m</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup>. Se tiñeron las células de MO de ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, M-CSF<sup>h/h</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup> con anticuerpos c-Kit, Sca1, CD150, CD48, CD16/32 y CD34 de linaje y se analizaron mediante citometría de flujo. (**A**) Las células de linaje<sup>-</sup> (superior) se bloquearon y se discriminaron basándose en la expresión de Sca1 y c-Kit (central). Las células Sca1+c-Kit<sup>+</sup> de linaje<sup>-</sup> (LSK) se bloquearon y se discriminaron adicionalmente basándose en la expresión de CD150 y CD48 (inferior). (**B**) Las células de linaje<sup>-</sup> se bloquearon previamente y se discriminaron basándose en la expresión de Sca1 y c-Kit (superior). Las células c-Kit+Sca1 de linaje<sup>-</sup> se bloquearon y se discriminaron adicionalmente basándose en la expresión de CD16/32 y CD34 (inferior).

### Descripción detallada

40 Antes de describir los métodos y composiciones actuales, debe entenderse que esta invención no se limita al método o composición particular descrita, ya que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

45 Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque pueden utilizarse en la puesta en práctica o el ensayo de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, a continuación, se describen métodos y materiales particulares.

50 Tal como será evidente para los expertos en la técnica tras la lectura de la presente divulgación, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en el presente documento tiene características y componentes discretos que fácilmente pueden separarse o combinarse con las características de cualquiera de las otras realizaciones. Cualquier método citado puede llevarse a cabo en el orden de los eventos citados o en cualquier otro orden que sea posible lógicamente.

55 Cabe destacar que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno" y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de dichas células y la referencia a "el péptido" incluye la referencia a uno o más péptidos y equivalentes de los mismos, *por ejemplo*, polipéptidos, conocido por los expertos en la técnica y así sucesivamente.

65 Las publicaciones descritas en el presente documento se proporcionan únicamente por su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. No debe interpretarse que nada en el presente documento constituya una admisión de que la presente invención no tenga derecho a anteponer dicha publicación por virtud de una

invención anterior.

Se proporcionan ratones modificados genéticamente que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano. También se proporcionan ratones modificados genéticamente que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano que se ha injertado con células humanas tales como células hematopoyéticas humanas. Estos ratones encuentran utilidad en una serie de aplicaciones, tales como en el modelado de la enfermedad inmune humana y la infección por patógenos; en cribas *in vivo* para agentes que modulan el desarrollo y/o actividad de las células hematopoyéticas, *por ejemplo*, en un estado saludable o enfermo; en cribas *in vivo* para agentes que son tóxicos para las células hematopoyéticas; en cribas *in vivo* para agentes que evitan, mitigan o revierten los efectos tóxicos de agentes tóxicos en las células hematopoyéticas; en cribas *in vivo* de las células hematopoyéticas humanas de un individuo para predecir la capacidad de respuesta de un individuo a una terapia de enfermedad, *etc.*

#### RATONES HUMANIZADOS CON M-CSF

En algunos aspectos de la invención, se proporciona un ratón humanizado con M-CSF. Por un ratón humanizado con M-CSF, o "ratón hM-CSF", se entiende un ratón que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano. Por una proteína del M-CSF humano, se entiende una proteína que es el M-CSF humano o es sustancialmente idéntica al M-CSF humano, *por ejemplo*, es 80 % o más idéntica, 85 % o más idéntica, 90 % o más idéntica o 95 % o más idéntica al M-CSF humano, *por ejemplo*, un 97 %, 98 % o 99 % idéntica al M-CSF humano. Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano es, por lo tanto, un polinucleótido que comprende una secuencia codificante para una proteína del M-CSF humano, *es decir*, el M-CSF humano o una proteína que es sustancialmente idéntica al M-CSF humano. El M-CSF (también conocido como CSF-1 (del inglés "colony stimulating factor 1"), por "factor 1 estimulante de colonias") es una citoquina que controla la producción, diferenciación y función de los macrófagos. La secuencia polipeptídica para el M-CSF humano y la secuencia de ácido nucleico que codifica para el M-CSF humano puede encontrarse en los N.º de Acceso Genbank NM\_000757.5 (variante 1), NM\_172210.2 (variante 2) y NM\_172212.2 (variante 4). El locus genómico que codifica la proteína del M-CSF humano puede encontrarse en el genoma humano en el cromosoma 1; NC\_000001.10 (110453233-110472355). La secuencia de proteínas está codificada por los exones 1 a 8 en este locus, mientras el exón 9 comprende una secuencia no traducida. Como tal, una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia codificante para el M-CSF humano comprende uno o más exones 1-8 del gen del M-CSF humano. En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico también comprende aspectos del locus genómico M-CSF humano, *por ejemplo*, intrones, secuencia no traducida 3' y/o 5' (UTR). En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico comprende regiones enteras del locus genómico M-CSF humano. En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico comprende el exón 2 del locus genómico M-CSF humano a 633 nt cadena abajo del exón 9 no codificante.

En los ratones humanizados con M-CSF desvelados en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano está unida operativamente a una o más secuencias reguladoras del gen del M-CSF de ratón. Las secuencias reguladoras del M-CSF de ratón son aquellas secuencias del locus genómico M-CSF de ratón que regula la expresión del M-CSF de ratón, *por ejemplo*, secuencia reguladora 5', *por ejemplo*, el promotor M-CSF, la región no traducida 5' M-CSF (UTR), *etc.*; secuencia reguladora 3', *por ejemplo*, la 3'UTR; y potenciadores, *etc.* El M-CSF de ratón se localiza en el cromosoma 3 en aproximadamente las posiciones 107.543.966-107.563.387 y la secuencia de codificación del M-CSF de ratón puede encontrarse en los N.º de Acceso Genbank NM\_007778.4 (isoforma 1), NM\_001113529.1 (isoforma 2) y NM\_001113530.1 (isoforma 3). Las secuencias reguladoras del M-CSF de ratón están bien definidas en la técnica y pueden identificarse fácilmente utilizando métodos *in silico*, *por ejemplo*, haciendo referencia a los números de acceso Genbank anteriores en el navegador UCSC Genome, en la web mundial en genome.ucsc.edu, o mediante métodos experimentales como se describe a continuación y en la técnica, *por ejemplo*, Abboud et al. (2003) Analysis of the Mouse CSF-1 Gene Promoter in a Transgenic Mouse Model. *J. Histochemistry y Cytochemistry* 51(7):941-949. En algunos casos, *por ejemplo*, cuando la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano se localiza en el locus genómico M-CSF de ratón, las secuencias reguladoras unidas operativamente a la secuencia codificante CSF humana son endógenas o nativas, del genoma de ratón, *es decir*, se presentaron en el genoma de ratón antes de la integración de las secuencias de ácido nucleico humanas.

En algunos casos, el ratón humanizado con M-CSF se genera mediante la integración aleatoria o inserción, de la secuencia de ácido nucleico humana que codifica la proteína del M-CSF humano o un fragmento de la misma, *es decir*, "secuencia de ácido nucleico del M-CSF humano" o "secuencia M-CSF humana", en el genoma. Por lo general, en dichas realizaciones, la localización de la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano en el genoma es desconocida. En otros casos, el ratón humanizado con M-CSF se genera mediante la integración dirigida o inserción, de la secuencia de ácido nucleico del M-CSF humano en el genoma, mediante, *por ejemplo*, recombinación homóloga. En la recombinación homóloga, un polinucleótido se inserta en el genoma hospedador en un locus diana mientras, simultáneamente, se elimina material genómico hospedador, *por ejemplo*, 50 pares de bases (pb) o más, 100 pb o más, 200 pb o más, 500 pb o más, 1 kB o más, 2 kB o más, 5 kB o más, 10 kB o más, 15 kB o más, 20 kB o más o 50 kB o más de material genómico, a partir del locus diana. Por lo tanto, *por ejemplo*, en un ratón humanizado con M-CSF que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano mediante el direccionamiento de la secuencia de ácido nucleico del M-CSF humano al

locus M-CSF de ratón, la secuencia de ácido nucleico del M-CSF humano puede reemplazar algunos o todos las secuencias de ratón, por ejemplo, exones y/o intrones, al locus M-CSF. En algunos de dichos casos, la secuencia de ácido nucleico M-CSF humano está integrada en el locus M-CSF de ratón de manera que la expresión de la secuencia del M-CSF humano está regulada por las secuencias reguladoras nativas o endógenas en el locus M-CSF de ratón. En otras palabras, la(s) secuencia(s) reguladora(s) a la que la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano está unida operativamente son las secuencias reguladoras del M-CSF nativas en el locus M-CSF de ratón.

En algunos casos, la integración de la secuencia del M-CSF humano no afecta la transcripción del gen en el que se ha integrado la secuencia del M-CSF humano. Por ejemplo, si la secuencia del M-CSF humano se integra en la secuencia codificante como una introna, o la secuencia del M-CSF humano comprende un péptido 2A, la secuencia del M-CSF humano se transcribirá y traducirá simultáneamente con el gen en el que se ha integrado la secuencia del M-CSF humano. En otros casos, la integración de la secuencia del M-CSF humano interrumpe la transcripción del gen en el que se ha integrado la secuencia del M-CSF humano. Por ejemplo, tras la integración de la secuencia del M-CSF humano mediante recombinación homóloga, se puede eliminar parte o la totalidad de la secuencia codificante en el locus de integración, de modo que la secuencia del M-CSF humano se transcribe en su locus. En algunos de dichos casos, la integración de la secuencia del M-CSF humano crea una mutación nula, y por lo tanto, un alelo nulo. Un alelo nulo es una copia mutante de un gen que carece por completo de la función normal de ese gen. Esto puede ser el resultado de la ausencia completa del producto génico (proteína, ARN) a nivel molecular, o la expresión de un producto génico no funcional. En el nivel fenotípico, un alelo nulo es indistinguible de una deleción del locus completo.

En algunos casos, el ratón humanizado con M-CSF comprende una copia de la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano. Por ejemplo, el ratón puede ser heterocigoto para la secuencia de ácido nucleico. En otras palabras, un alelo en un locus comprenderá la secuencia de ácido nucleico, mientras que el otro será el alelo endógeno. Por ejemplo, tal como se ha tratado anteriormente, en algunos casos, la secuencia de ácido nucleico del M-CSF humano está integrada en el locus M-CSF de ratón de manera que crea un alelo nulo para el M-CSF de ratón. En algunas de dichas realizaciones, el ratón humanizado con M-CSF puede ser heterocigoto para la secuencia de ácido nucleico que codifica, es decir, el ratón humanizado con M-CSF comprende un alelo nulo para el M-CSF de ratón (el alelo que comprende la secuencia de ácido nucleico) y un alelo M-CSF endógeno (tipo silvestre o de otro modo). En otras palabras, el ratón es un ratón M-CSF<sup>h/m</sup>, donde "h" representa el alelo que comprende la secuencia humana y "m" representa el alelo endógeno. En otros casos, el humanizado con M-CSF comprende dos copias de la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del M-CSF humano. Por ejemplo, el ratón puede ser homocigoto para la secuencia de ácido nucleico, es decir, ambos alelos para un locus en el genoma diploide comprenderán la secuencia de ácido nucleico, es decir, el ratón humanizado con M-CSF comprende dos alelos nulos para el M-CSF de ratón (el alelo que comprende la secuencia de ácido nucleico). En otras palabras, el ratón es un ratón M-CSF<sup>h/h</sup>.

Sorprendentemente, ratones humanizados con M-CSF, por ejemplo, tal como los descritos anteriormente, por ejemplo, ratones M-CSF<sup>h/h</sup> y M-CSF<sup>h/m</sup>, exhiben desarrollo y funciones normales o de tipo silvestre de los macrófagos y monocitos y tejidos que se desarrollan a partir de células del linaje de los macrófagos, por ejemplo, hueso. Por ejemplo, los ratones humanizados exhiben propiedades dentales y óseas normales así como un contenido de médula ósea, frecuencias de células mieloides en la médula ósea, bazo y sangre periférica y frecuencias de macrófagos en la médula ósea y el bazo normales.

En algunos casos, el ratón humanizado con M-CSF comprende otras modificaciones genéticas. Por ejemplo, el ratón humanizado con M-CSF puede comprender al menos un alelo nulo para el gen *Rag2* ("gen 2 activador de la recombinación", cuya secuencia codificante puede encontrarse en el número de acceso Genbank 1.NM\_009020.3). En algunas realizaciones, el ratón humanizado con M-CSF comprende dos alelos nulos para *Rag2*. En otras palabras, el ratón humanizado con M-CSF es homocigoto nulo para *Rag2*. Como otro ejemplo, el ratón humanizado con M-CSF comprende al menos un alelo nulo para el gen *IL2rg* ("receptor gamma de interleuquina 2", también conocido como cadena gamma común o  $\gamma C$ , cuya secuencia codificante puede encontrarse en el número de acceso Genbank 1.NM\_013563.3). En algunas realizaciones, el ratón humanizado con M-CSF comprende dos alelos nulos para *IL2rg*. En otras palabras, el ratón humanizado con M-CSF es homocigoto nulo para *IL2rg*. En algunas realizaciones, el ratón comprende un alelo nulo para *Rag2* e *IL2rg*, es decir, es *Rag2*<sup>-/-</sup> *IL2RG*<sup>-/-</sup>. También se contemplan otras modificaciones genéticas. Por ejemplo, el ratón humanizado con M-CSF puede comprender modificaciones en otros genes asociados con el desarrollo y/o función de las células hematopoyéticas y el sistema inmune, por ejemplo, el reemplazo de uno u otros genes de ratón con una secuencia de ácido nucleico que codifica el ortólogo humano. Además o como alternativa, el ratón humanizado con M-CSF puede comprender modificaciones en genes asociados con el desarrollo y/o función de otras células y tejidos, por ejemplo, genes asociados con trastornos o enfermedades humanas o genes que, cuando se modifican en ratones, proporcionan modelos de ratón de trastornos o enfermedades humanas.

En algunos aspectos de la invención, el ratón humanizado con M-CSF, por ejemplo, un ratón *Rag2*<sup>-/-</sup> *IL2rg*<sup>-/-</sup> hM-CSF, se injerta o trasplanta, con células. Las células pueden ser células mitóticas o células post-mitóticas, e incluyen células de interés tales como células madre pluripotentes, por ejemplo, células ME, células MPi y células germinales

embrionarias; y células somáticas, *por ejemplo*, fibroblastos, células hematopoyéticas, neuronas, células musculares, células óseas, células endoteliales vasculares, células intestinales y similares, y sus progenitores restringidos por linaje. Las poblaciones de células de interés particular incluyen aquellas que comprenden células madre hematopoyéticas o progenitoras, que contribuirán o reconstituirán el sistema hematopoyético del ratón humanizado con M-CSF, *por ejemplo*, leucocitos de sangre periférica, células hepáticas fetales, hueso fetal, timo fetal, ganglios linfáticos fetales, piel vascularizada, segmentos arteriales y células madre hematopoyéticas purificadas, *por ejemplo*, CMH movilizadas o CMH de sangre del cordón umbilical. Las células pueden ser de cualquier especie de mamífero, *por ejemplo*, murino, roedor, canino, felino, equino, bovino, óvido, primate, ser humano, *etc.* Las células pueden ser de líneas celulares establecidas o pueden ser células primarias, donde "células primarias", "líneas celulares primarias" y "cultivos primarios" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a células y cultivos celulares que han derivado de un sujeto y permitido el crecimiento *in vitro* durante un número limitado de pasajes, *es decir*, divisiones, del cultivo. *Por ejemplo*, los cultivos primarios son cultivos que pueden haber sido pasados 0 veces, 1 vez, 2 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces o 15 veces, pero no suficientes veces pasan por la etapa de crisis. *Por lo general*, las líneas celulares primarias de la presente invención se mantienen durante menos de 10 pases *in vitro*.

Si las células son células primarias, pueden cosecharse de un individuo por cualquier método conveniente. *Por ejemplo*, células, *por ejemplo*, células de sangre, *por ejemplo*, leucocitos, pueden cosecharse mediante aféresis, leucocitaféresis, separación por gradiente de densidad, *etc.* Como otro ejemplo, células, *por ejemplo*, piel, músculo, médula ósea, bazo, hígado, páncreas, pulmón, intestino, tejido estomacal, *etc.* pueden cosecharse mediante biopsia. Puede utilizarse una solución apropiada para la dispersión o suspensión de las células cosechadas. Dicha solución generalmente será una solución de sal equilibrada, *por ejemplo*, solución salina normal, PBS, solución de sal equilibrada de Hank, *etc.*, convenientemente complementada con suero de ternera fetal u otros factores de origen natural, junto con un tampón aceptable a baja concentración, generalmente de 5-25 mM. Los tampones convenientes incluyen HEPES, tampones fosfato, tampones lactato, *etc.*

En algunos casos, se trasplantará en el ratón humanizado una población heterogénea de células. En otros casos, una población de células que se enriquece para un tipo particular de célula, *por ejemplo*, una célula progenitora, *por ejemplo*, una célula progenitora hematopoyética, se injertará en el ratón humanizado. El enriquecimiento de una población de células de interés puede ser mediante cualquier técnica de separación conveniente. *Por ejemplo*, las células de interés pueden enriquecerse mediante métodos de cultivo. En dichos métodos de cultivo, normalmente, se añaden factores de crecimiento y nutrientes particulares a un cultivo que promueven la supervivencia y/o proliferación de una población de células sobre otras. Otras condiciones de cultivo que afectan la supervivencia y/o proliferación incluyen crecimiento en sustratos adherentes o no adherentes, cultivo durante periodos de tiempo particulares, *etc.* Tales condiciones de cultivo son bien conocidas en la técnica. Como otro ejemplo, las células de interés pueden enriquecerse mediante la separación de células de interés de la población inicial mediante técnicas de separación por afinidad. Las técnicas para la separación por afinidad pueden incluir separación magnética que utiliza perlas magnéticas recubiertas con un reactivo de afinidad, cromatografía de afinidad, "cribado" con un reactivo de afinidad unido a una matriz sólida, *por ejemplo*, una placa, agentes citotóxicos unidos a un reactivo de afinidad o utilizado junto con un reactivo de afinidad, *por ejemplo*, complemento o citotoxinas u otra técnica conveniente. Las técnicas que proporcionan una separación precisa incluyen clasificadores de células activadas por fluorescencia, que pueden tener diversos grados de sofisticación, como canales de color múltiples, canales de detección de dispersión de luz obtusa y de ángulo bajo, canales de independencia, *etc.* Las células pueden seleccionarse contra células muertas mediante el empleo de colorantes asociados con células muertas (*por ejemplo*, yoduro de propidio). Puede emplearse cualquier técnica que no sea indebidamente perjudicial para la viabilidad de las células de interés.

*Por ejemplo*, utilizando técnicas de separación por afinidad, las células que no son las células de interés para el trasplante pueden agotarse de la población al poner en contacto la población con reactivos de afinidad que reconocen específicamente y unen selectivamente marcadores que no se expresan en las células de interés. *Por ejemplo*, para enriquecer a una población de células progenitoras hematopoyéticas, se podrían agotar las células que expresan marcadores de células hematopoyéticas maduras. Además o como alternativa, la selección positiva y la separación se pueden realizar mediante el contacto de la población con reactivos de afinidad que reconocen específicamente y unen selectivamente marcadores asociados con células progenitoras hematopoyéticas, *por ejemplo*, CD34, CD133, *etc.* *Por "unión selectiva"* se entiende que la molécula se une preferentemente a la diana de interés o se une con mayor afinidad a la diana que a otras moléculas. *Por ejemplo*, un anticuerpo se unirá a una molécula que comprende un epítopo para el que es específico y no a epítomos no relacionados. En algunos ejemplos, el reactivo de afinidad puede ser un anticuerpo, *es decir*, un anticuerpo que es específico para CD34, CD133, *etc.* En algunos ejemplos, el reactivo de afinidad puede ser un receptor o ligando específico para CD34, CD133, *etc.*, *por ejemplo*, un ligando y receptor peptídico; moléculas efectoras y receptoras, un receptor de linfocitos T específico para CD34, CD133, *etc.*, y similares. En algunos ejemplos, pueden utilizarse reactivos de afinidad múltiple específicos para el marcador de interés.

Los anticuerpos y los receptores de linfocitos T que se utilizan como reactivos de afinidad pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden ser producidos por animales transgénicos, animales inmunizados, linfocitos B humanos o de animal inmortalizados, células transfectadas con vectores de ADN que codifica el anticuerpo o el receptor de linfocitos T, *etc.* Los detalles de la preparación de anticuerpos y su idoneidad para su uso como miembros de unión

- específica son bien conocidos por los expertos en la técnica. De particular interés es la utilización de anticuerpos marcados como reactivos de afinidad. De manera conveniente, estos anticuerpos están conjugados con una etiqueta para utilizar en la separación. Las etiquetas incluyen perlas magnéticas, que permiten la separación directa; biotina, que se puede eliminar con avidina o estreptavidina unida a un soporte; fluorocromos, que pueden utilizarse con un clasificador celular activado por fluorescencia; o similares, para permitir la facilidad de separación del tipo de célula particular. Los fluorocromos que encuentran utilidad incluyen ficobiliproteínas, por ejemplo, ficoeritrina y alofocianinas, fluoresceína y rojo Texas. Con frecuencia, cada anticuerpo se marca con un fluorocromo diferente, para permitir la clasificación independiente para cada marcador.
- 10 La población inicial de células se pone en contacto con el (los) reactivo(s) de afinidad y se incuba durante un período de tiempo suficiente para unir los antígenos de superficie celular disponibles. La incubación generalmente será de al menos aproximadamente 5 minutos y generalmente de menos de aproximadamente 60 minutos. Es deseable tener una concentración suficiente de anticuerpos en la mezcla de reacción, de modo que la eficacia de la separación no está limitada por la falta de anticuerpos. La concentración apropiada se determina mediante titulación, pero normalmente será una dilución de anticuerpo en el volumen de la suspensión celular que es aproximadamente 1:50 (es decir, 1 parte de anticuerpo frente a 50 partes de volumen de reacción), aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:150, aproximadamente 1:200, aproximadamente 1:250, aproximadamente 1:500, aproximadamente 1:1000, aproximadamente 1:2000, o aproximadamente 1:5000. El medio en el que se suspenderán las células será cualquier medio que mantenga la viabilidad de las células. Un medio preferido es solución salina tamponada con fosfato que contiene de 0,1 a 0,5 % de BSA o 1-4 % de suero de cabra. Varios medios están disponibles comercialmente y pueden utilizarse de acuerdo con la naturaleza de las células, incluyendo medio Eagle modificado por Dulbecco (dMEM), solución salina equilibrada de Hank (HBSS), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (dPBS), RPMI, medio de Iscove, PBS con EDTA 5 mM, etc., frecuentemente complementado con suero de ternera fetal, BSA, HSA, suero de cabra, etc.
- 25 Las células en la población contactada que se etiquetan por el reactivo de afinidad se seleccionan mediante cualquier técnica de separación por afinidad conveniente, *por ejemplo*, como se describe anteriormente o como se conoce en la técnica. Después de la separación, las células separadas pueden recogerse en cualquier medio apropiado que mantenga la viabilidad de las células, que generalmente tienen un cojín de suero en el fondo del tubo de recogida. Varios medios están disponibles comercialmente y pueden utilizarse de acuerdo con la naturaleza de las células, que incluyen dMEM, HBSS, dPBS, RPMI, medio de Iscove, etc., frecuentemente complementado con suero de ternera fetal.
- 30 Se logran de esta manera composiciones altamente enriquecidas para un tipo celular de interés, por ejemplo, células hematopoyéticas. Las células serán aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o más de la composición celular, aproximadamente 95 % o más de la composición celular enriquecida y, preferentemente, serán aproximadamente 95 % o más de la composición celular enriquecida. En otras palabras, la composición será una composición sustancialmente pura de las células de interés.
- 40 Las células a trasplantar en un ratón humanizado con M-CSF, sea una población heterogénea de células o una población enriquecida de células, pueden trasplantarse inmediatamente. Como alternativa, las células pueden congelarse a temperaturas de nitrógeno líquido y almacenarse durante largos períodos de tiempo, descongelarse y reutilizarse. En tales casos, las células usualmente se congelarán en DMSO al 10 %, suero al 50 %, medio tamponado al 40 % o alguna otra solución similar como se utiliza comúnmente en la técnica para preservar las células a tales temperaturas de congelación, y se descongelarán de la manera comúnmente conocida en la técnica para descongelar células cultivadas congeladas. Además o como alternativa, las células pueden cultivarse *in vitro* en diversas condiciones de cultivo. El medio de cultivo puede ser líquido o semisólido, *por ejemplo*, que contenga agar, metilcelulosa, etc. La población celular puede suspenderse convenientemente en un medio nutriente apropiado, tal como DMEM o RPMI-1640 modificado de Iscove, normalmente complementado con suero de ternera fetal (aproximadamente al 5-10 %), L-glutamina, un tior, particularmente 2-mercaptoetanol y antibióticos, *por ejemplo*, penicilina y estreptomycin. El cultivo puede contener factores de crecimiento a los que las células son sensibles. Los factores de crecimiento, como se definen en el presente documento, son moléculas capaces de promover la supervivencia, crecimiento y/o diferenciación de las células, ya sea en cultivo o en el tejido intacto, a través de efectos específicos sobre un receptor transmembrana. Los factores de crecimiento incluyen factores polipeptídicos y no polipeptídicos.
- 55 Las células pueden modificarse genéticamente antes de trasplantarse a un ratón humanizado con M-CSF, *por ejemplo*, para proporcionar un marcador seleccionable o trazable, para inducir un defecto genético en las células (*por ejemplo*, para el modelado de enfermedades), para reparar un defecto genético o expresar ectópicamente un gen en las células (*por ejemplo*, para determinar si dichas modificaciones afectarán el curso de la enfermedad), etc. Las células pueden modificarse genéticamente mediante transfección o traducción con un vector adecuado, recombinación homóloga u otra técnica apropiada, para que expresen un gen de interés, o con un ARNm antisentido, ARNip o ribozimas para bloquear la expresión de un gen no deseado. Se conocen diversas técnicas en la técnica para la introducción de ácidos nucleicos en células diana. Para demostrar que se ha modificado genéticamente las células, se pueden emplear diversas técnicas. El genoma de las células puede restringirse y

utilizarse con o sin amplificación. Puede emplearse la reacción en cadena de la polimerasa; electroforesis en gel; análisis de restricción; transferencias de Southern, Northern y Western; secuenciación; o similares. Los métodos generales en bioquímica molecular y celular para estos y otros propósitos divulgados en esta aplicación se pueden encontrar en libros de texto estándar como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Ed. (Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4ª Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplift & Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); y Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998). Los reactivos, vectores de clonación y kits para la manipulación genética a los que se hace referencia en esta divulgación están disponibles en proveedores comerciales como BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich y ClonTech.

Las células pueden trasplantarse en el ratón humanizado con M-CSF por cualquier método conveniente, incluyendo, por ejemplo, inyección intrahepática, inyección de vena caudal, inyección retroorbital y similares. Por lo general, se trasplantan aproximadamente  $0,5 \times 10^5$ - $2 \times 10^6$  células pluripotentes o progenitoras, por ejemplo, aproximadamente  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  células, o aproximadamente  $2 \times 10^5$ - $5 \times 10^5$  células. En algunos casos, el ratón se irradia subletalmente antes de trasplantar las células humanas. En otras palabras, el ratón se expone a una dosis subletal de radiación, *por ejemplo*, como se describe en la sección de ejemplos a continuación y como es bien conocido en la técnica. El ratón humanizado con M-CSF injertado se mantiene en condiciones de laboratorio de cría de animales durante al menos 1 semana, *por ejemplo*, 1 semana o más o dos semanas o más, a veces 4 semanas o más y en algunos casos 6 semanas o más, para permitir una reconstitución suficiente del sistema inmune con las células injertadas.

Como se demuestra en la sección de ejemplos siguientes, los ratones humanizados con M-CSF demuestran una capacidad significativamente aumentada para injertar y mantener células hematopoyéticas humanas en comparación con otras cepas de ratón que se han desarrollado para este fin y otros ratones transgénicos con M-CSF. Por ejemplo, la transferencia intrahepática de células madre y progenitoras hematopoyéticas derivadas del hígado fetal humano (CD34<sup>+</sup>) a ratones recién nacidos da como resultado una diferenciación más eficaz y frecuencias mejoradas de monocitos/macrófagos humanos en la médula ósea, bazo, sangre periférica, pulmones, hígado y la cavidad peritoneal. Se observan proporciones significativas de células humanas CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> a las 16-20 semanas. Específicamente, los ratones humanizados con M-CSF injertados con células hematopoyéticas demuestran una o más, en algunos casos, dos o más, en algunos casos, tres o más, en algunos casos cuatro o más, en algunos casos todas las características siguientes: expresan el M-CSF humano en la médula ósea, bazo, sangre, hígado, cerebro, pulmón, testículos y riñones a un nivel comparable a la expresión del M-CSF de ratón en un ratón de tipo silvestre; exhiben una frecuencia de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> del bazo que es de 2 a 6 veces mayor que hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en un ratón injertado que no expresa hM-CSF; exhiben una frecuencia en células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> de la sangre periférica que es de 2 a 8 veces mayor que hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en un ratón injertado que no expresa hM-CSF; exhiben un nivel de células del linaje monocito/macrófago hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en sangre de aproximadamente 15 a aproximadamente el 40 %; exhiben un nivel de células de linaje monocito/macrófago hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en sangre de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 % a aproximadamente 20 semanas de edad; exhiben una respuesta a la inyección de LPS que es aproximadamente 1,5 a aproximadamente 6 veces mayor con respecto al porcentaje de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en el hígado que los ratones que carecen del M-CSF humano; exhiben una producción mejorada de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>hCD45<sup>+</sup> en el bazo aproximadamente 48 horas después de la inyección de LPS, en donde la mejora es aproximadamente de 2 a aproximadamente 5 veces frente a un ratón injertado que carece del hM-CSF; exhiben una producción mejorada de IL-6 humana en suero en respuesta a LPS, en donde el nivel de hIL-6 aproximadamente 6 horas después de la inyección de LPS mejora aproximadamente de 2 a aproximadamente 5 veces en un ratón injertado que carece de hM-CSF; exhiben secreción *in vitro* por un monocito y/o un macrófago tras la estimulación con LPS que es aproximadamente de 2 a 3 veces mayor con respecto al hTNF $\alpha$  que un ratón injertado que carece de un gen del hM-CSF; exhiben secreción *in vitro* por un monocito y/o un macrófago tras la estimulación con LPS que es aproximadamente de 2 a 4 veces mayor con respecto al hIL-6 que un ratón injertado que carece de un gen del hM-CSF; exhiben secreción *in vitro* por un monocito y/o un macrófago tras la estimulación con I:C que es aproximadamente de 3 a 6 veces mayor con respecto al hINF $\alpha$  que un ratón injertado que carece de un gen del hM-CSF; exhiben secreción *in vitro* por un monocito y/o un macrófago tras la estimulación con I:C que es aproximadamente de 2 a 3 veces mayor con respecto al hINF $\beta$  que un ratón injertado que carece de un gen del hM-CSF; exhiben una fagocitosis mejorada en comparación con un ratón genéticamente modificado e injertado que carece de un gen del hM-CSF; exhiben una quimiotaxis *in vitro* mejorada en respuesta a Mip3 $\beta$  en comparación con un ratón genéticamente modificado e injertado que carece de un gen del hM-CSF; y; exhiben regulación positiva *in vitro* de una molécula coestimuladora en respuesta a la estimulación con LPS, en donde la molécula coestimuladora se selecciona de CD40 humano, CD80 humano, CD86 humano, HLA-DR humano y una combinación de las mismas.

## UTILIDAD

Los ratones humanizados con M-CSF y los ratones humanizados con M-CSF injertados con células hematopoyéticas humanas, *por ejemplo*, ratones *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup>* hM-CSF injertados y, opcionalmente, otras modificaciones genéticas son útiles en muchas aplicaciones. Por ejemplo, estos ratones proporcionan un sistema útil para modelar enfermedades inmunes humanas y patógenos humanos. Por ejemplo, los ratones diana son útiles para modelar una malignidad hematopoyética humana que se origina a partir de una célula hematopoyética humana

temprana, *por ejemplo*, de una célula progenitora o madre hematopoyética humana. Como otro ejemplo, los ratones sujetos son útiles para estudiar patógenos humanos, *por ejemplo*, virus, hongos y bacterias, que normalmente no infectan ratones.

5 Un ejemplo de un patógeno humano que normalmente no infecta a los ratones es el agente causante de la fiebre tifoidea, *S. typhi*. La fiebre tifoidea afecta a más de 21 millones de personas en todo el mundo, principalmente en el mundo en desarrollo, incluyendo alrededor de 400 casos/año en los Estados Unidos. La fiebre tifoidea se ha tratado con los fármacos amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cloranfenicol, ciprofloxacino, cotrimoxazol, ertapenem, imipenem, fluoroquinolonas (*por ejemplo*, ciprofloxacina, gatifloxacina, ofloxacina),  
10 estreptomycin, sulfadiazina, sulfametoxazol, tetraciclina y combinaciones de los mismos. Las infecciones recurrentes son comunes, lo que limita el manejo de la enfermedad mediante la terapia con antibióticos. Además, la resistencia a múltiples fármacos también prevalece con las infecciones por *S. typhi*.

Se necesitan nuevas terapias, nuevas vacunas y nuevas formas de probar la eficacia de terapias y vacunas. Un  
15 ratón capaz de ser infectado por *S. typhi*, por ejemplo, sería útil para identificar nuevas terapias y nuevas vacunas. Las nuevas terapias y nuevas vacunas podrían probarse en un ratón de este tipo, *por ejemplo*, determinando la cantidad de *S. typhi* en el ratón (en sangre o en un tejido dado) en respuesta al tratamiento con un supuesto agente anti-*S. typhi*, o inoculando el ratón con una supuesta vacuna seguida por la exposición a una administración infecciosa de *S. typhi*, y observando cualquier cambio en la infectividad debido a la inoculación por la supuesta  
20 vacuna en comparación con un control no inoculado con la vacuna pero infectado con *S. typhi*.

Un ratón humanizado con M-CSF injertado con células hematopoyéticas humanas, *por ejemplo*, un ratón *Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF*, es útil para el estudio de patógenos humanos, *es decir*, patógenos que infectan seres humanos; la  
25 respuesta del sistema inmune humano a la infección por patógenos humanos; y la eficacia de los agentes para proteger y/o tratar la infección por patógenos humanos. El patógeno puede ser un virus, un hongo, una bacteria, *etc.* Los ejemplos no limitantes de patógenos virales incluyen el virus de la gripe humana o porcina o aviar. Los ejemplos no limitantes de patógenos bacterianos incluyen micobacterias, por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) y enterobacterias, por ejemplo, *Salmonella typhi* (*S. typhi*).

30 Por ejemplo, ratones humanizados con M-CSF injertados son útiles como modelo animal no humano de infección por *S. typhi*. Por el contrario, ratones de tipo silvestre y otros ratones inmunodeprimidos conocidos (*por ejemplo*, ratones knock-out para el gen RAG1/RAG2), no son capaces de ser infectados por *S. typhi*. Como se analiza anteriormente, los ratones humanizados con M-CSF injertados como se describe en el presente documento muestran un injerto mejorado de células humanas en comparación con ratones injertados que no comprenden una  
35 proteína del M-CSF humano. Esta mejora es suficiente para mantener una infección productiva de *S. typhi*, es decir, *S. typhi* es capaz de reproducirse en el ratón, es decir, el ratón infectado es capaz de albergar y reproducir *S. typhi* en una o más de sus células. En una realización específica, el ratón es capaz de reproducir *S. typhi* al menos una semana, 10 días, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas después de una introducción inicial o exposición infecciosa de *S. typhi*. En otras palabras, el ratón es capaz de mantener un título o nivel de *S. typhi* en su sangre o  
40 en al menos un tejido durante al menos una semana, 10 días, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas después de una exposición infecciosa a *S. typhi*. Se pueden encontrar ejemplos de métodos para infectar ratones con *S. typhi* y para evaluar la infección en, por ejemplo, la Solicitud de Patente de EE.UU. n.º 2011/0200982.

Como otro ejemplo, ratones humanizados con M-CSF, *por ejemplo*, ratones *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertados, son  
45 útiles como modelo animal no humano de infección por *M. tuberculosis*. El injerto mejorado de células hematopoyéticas humanas en ratones que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína del M-CSF humano es suficiente para mantener una infección productiva de *M. tuberculosis*, es decir, *M. tuberculosis* es capaz de reproducirse en el ratón, *es decir*, el ratón infectado es capaz de albergar y reproducir *M. tuberculosis* en una o más de sus células. En algunas de dichas realizaciones, el ratón produce una respuesta inmune antimicobacteriana a una  
50 micobacteria patógena humana, en donde la respuesta comprende la formación de un granuloma mediado por células inmunes humanas y que comprende una célula inmune humana. En algunas de dichas realizaciones, el granuloma es un granuloma de pulmón. En algunas de dichas realizaciones, el granuloma es un granuloma bien definido. Se pueden encontrar ejemplos de métodos para infectar ratones con *M. tuberculosis* y para evaluar la infección en, por ejemplo, la Solicitud de Patente de EE.UU. n.º 2011/0200982.

Otros ejemplos de patógenos humanos que no infectan a un ratón que expresa el M-CSF humano y, en algunos  
55 casos, una o más modificaciones genéticas, *por ejemplo*, como se describe en el presente documento o que infectan ratones de tipo silvestre, en el que el ratón de tipo silvestre después de la infección no modela una respuesta inmune que un ser humano produce en respuesta al patógeno, será bien conocido por el experto en la materia.

Dichos modelos de ratón de infección por patógenos son útiles en la investigación, *por ejemplo*, para comprender  
60 mejor la progresión de la infección humana. Dichos modelos de infección de ratón también son útiles en el descubrimiento de fármacos, *por ejemplo*, para identificar agentes candidatos que protegen o tratan la infección.

Los ratones humanizados con M-CSF injertados con células hematopoyéticas humanas proporcionan un sistema útil  
65 para cribar agentes candidatos para otras actividades deseadas *in vivo*, así como, *por ejemplo*, para agentes que



son capaces de modular (*es decir*, promover o suprimir) el desarrollo y/o actividad de células hematopoyéticas, *por ejemplo*, la actividad de linfocitos B, linfocitos T, células NK, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, *etc.*, *por ejemplo*, en un estado saludable o enfermo, *por ejemplo*, para identificar nuevas terapias y/o desarrollar una mejor comprensión de las bases moleculares del desarrollo y la función del sistema inmune; para agentes que son tóxicos para las células hematopoyéticas, *por ejemplo*, linfocitos B, linfocitos T, células NK, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, *etc.*, y progenitores de las mismas; y para agentes que evitan, mitigan o revierten los efectos tóxicos de agentes tóxicos en células hematopoyéticas, *por ejemplo*, linfocitos B, linfocitos T, células NK, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, *etc.*, y combinaciones de las mismas; *etc.* Como otro ejemplo adicional, los ratones modificados genéticamente descritos en el presente documento proporcionan un sistema útil para predecir la capacidad de respuesta de un individuo a una terapia de enfermedad, *por ejemplo*, proporcionando una plataforma *in vivo* para cribar la capacidad de respuesta del sistema inmune de un individuo a un agente, *por ejemplo*, un agente terapéutico, para predecir la capacidad de respuesta de un individuo a ese agente.

En ensayos de cribado para agentes biológicamente activos, ratones humanizados con M-CSF, *por ejemplo*, ratones *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF*, que se han injertado con células hematopoyéticas humanas y, en algunos casos, infectadas con patógenos humanos, o células que se injertan en un ratón humanizado con M-CSF, se ponen en contacto con un agente candidato de interés y se evalúa el efecto del agente candidato mediante el control de uno o más parámetros de salida. Estos parámetros de salida pueden reflejar la viabilidad de las células, *por ejemplo*, el número total de células hematopoyéticas o el número de células de un tipo de células hematopoyéticas particular, o del estado apoptótico de las células, *por ejemplo*, la cantidad de fragmentación del ADN, la cantidad de zeiosis celular, la cantidad de fosfatidilserina en la superficie de la célula y similares mediante métodos que son bien conocidos en la técnica. Como alternativa o además, estos parámetros de salida pueden reflejar la capacidad de diferenciación de las células, *por ejemplo*, las proporciones de células diferenciadas y tipos de células diferenciadas. Como alternativa o además, estos parámetros de salida pueden reflejar la función de las células, *por ejemplo*, las citoquinas y quimioquinas producidas por las células, la capacidad de las células para llegar a casa y extravasarse a 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 la extensión de la infección de patógenos en el animal, *por ejemplo*, el título de patógeno en el ratón, la presencia de granulomas en el ratón, *etc.*

Los parámetros son componentes cuantificables de las células, particularmente componentes que se pueden medir con precisión, deseablemente en un sistema de alto rendimiento. Un parámetro puede ser cualquier componente celular o producto celular, incluido el determinante de la superficie celular, receptor, proteína o modificación conformacional o postraduccional de los mismos, lípido, hidrato de carbono, molécula orgánica o inorgánica, ácido nucleico, *por ejemplo*, ARNm, ADN, *etc.* o una porción que procede de dicho componente celular o combinaciones de los mismos. Si bien la mayoría de los parámetros proporcionarán una lectura cuantitativa, en algunos casos será aceptable un resultado semicuantitativo o cualitativo. Las lecturas pueden incluir un solo valor determinado, o pueden incluir la media, el valor de la media o la varianza, *etc.* Característicamente, se obtendrá un intervalo de valores de lectura de parámetros para cada parámetro a partir de una multiplicidad de los mismos ensayos. Se espera una variabilidad y se obtendrá un intervalo de valores para cada uno de los conjuntos de parámetros de prueba utilizando métodos estadísticos estándar con un método estadístico común utilizado para proporcionar valores únicos.

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

Los agentes candidatos incluyen moléculas orgánicas que comprenden grupos funcionales necesarios para las interacciones estructurales, particularmente enlaces de hidrógeno, y normalmente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, frecuentemente, al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos, a menudo, comprenden estructuras cíclicas de carbono o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los agentes candidatos también se encuentran entre las 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.* Los ejemplos de agentes farmacéuticos adecuados para la invención son los descritos en, "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Goodman y Gilman, McGraw-Hill, Nueva York, N.Y., (1996), novena edición. También se incluyen toxinas y agentes de guerra biológicos y químicos, *por ejemplo*, véase Somani, S. M. (Ed.), "Chemical Warfare Agents," Academic Press, Nueva York, 1992).

Los agentes candidatos de interés para el cribado también incluyen ácidos nucleicos, *por ejemplo*, ácidos nucleicos que codifican ARNip, ARNhc, moléculas antisentido o ARNmi o ácidos nucleicos que codifican polipéptidos. Se encuentran disponibles muchos vectores útiles para transferir ácidos nucleicos a células diana. Los vectores pueden

mantenerse episomalmente, *por ejemplo*, como plásmidos, ADN de minicírculos, vectores derivados de virus tales como citomegalovirus, adenovirus, *etc.* o pueden estar integrados en el genoma de la célula diana, a través de recombinación homóloga o integración aleatoria, *por ejemplo*, vectores derivados de retrovirus tales como MMLV, HIV-1, ALV, *etc.* Los vectores se pueden proporcionar directamente a las células sujeto. En otras palabras, las células pluripotentes se ponen en contacto 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, *por ejemplo*, células en cultivo o células en un ratón, con vectores de ácidos nucleicos, tales como electroporación, transfección con cloruro de calcio y lipofección, son bien conocidos en la técnica. Como alternativa, el ácido nucleico de interés puede proporcionarse a las células a través de un virus. En otras palabras, las células se ponen en contacto 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*, incapaces de producir proteínas virales requeridas para una infección productiva. Más bien, la replicación del vector requiere crecimiento en una línea celular de empaquetamiento. Para generar partículas víricas que comprenden ácidos nucleicos de interés, los ácidos nucleicos retrovirales que comprenden el ácido nucleico se empaquetan en cápsidas virales mediante una línea celular de empaquetamiento. Las diferentes líneas celulares de empaquetamiento proporcionan una proteína de envoltura diferente para ser incorporada en la cápside, esta proteína de envoltura determina la especificidad de la partícula viral para las células. Las proteínas de envoltura son de al menos tres tipos, ecotrópicas, anfotrópicas y xenotrópicas. Los retrovirus empaquetados con proteína de envoltura ecotrópica, *por ejemplo*, MMLV, son capaces de infectar la mayoría de los tipos de células murinas y de rata, y se generan mediante la utilización de líneas celulares de empaquetamiento ecotrópico como BOSC23 (Pear et al. (1993) P.N.A.S. 90:8392-8396). Los retrovirus que llevan proteína de envoltura anfotrópica, *por ejemplo*, 4070A (Danos et al, citado anteriormente), son capaces de infectar la mayoría de los tipos celulares de mamíferos, incluyendo seres humanos, perros, y ratones, y se generan mediante la utilización de líneas celulares de empaquetamiento anfotrópico tales 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, *por ejemplo*, AKR env, son capaces de infectar la mayoría de los tipos celulares de mamíferos, excepto las células murinas. La línea celular de empaquetamiento apropiada puede utilizarse para asegurar que las células de interés, en algún caso, las células injertadas, en algún caso, la célula del hospedador, *es decir*, las humanizadas con M-CSF son la diana de las partículas virales empaquetadas.

Los vectores utilizados para proporcionar el ácido nucleico de interés para las células sujeto comprenderán normalmente promotores adecuados para dirigir la expresión, es decir, la activación transcripcional, del ácido nucleico de interés. Esto puede incluir promotores de actuación ubicua, *por ejemplo*, el promotor CMV-b-actina, o promotores inducibles, tales como promotores que son activos en poblaciones celulares particulares o que responden a la presencia de fármacos tales como tetraciclina. Por activación transcripcional, se pretende que la transcripción se incremente por encima de los niveles basales en la célula diana en al menos aproximadamente 10 veces, en al menos aproximadamente 100 veces, más generalmente en al menos aproximadamente 1000 veces. Además, los vectores utilizados para proporcionar factores de reprogramación a las células sujeto pueden incluir genes que luego deben eliminarse, *por ejemplo*, utilizando un sistema recombinasa tal como Cre/Lox, o las células que los expresan destruidos, *por ejemplo*, incluyendo genes que permiten toxicidad selectiva como TK herpesvirus, bcl-xs, *etc.*

Los agentes candidatos de interés para el cribado también incluyen polipéptidos. Dichos polipéptidos pueden fusionarse opcionalmente a un dominio polipeptídico que aumenta la solubilidad del producto. El dominio puede unirse al polipéptido a través de un sitio de escisión de proteasa definido, *por ejemplo*, una secuencia TEV, que se escinde mediante la proteasa TEV. El enlazador también puede incluir una o más secuencias flexibles, *por ejemplo*, 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, *por ejemplo*, 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, *por ejemplo*, el dominio HA de la gripe; y otros polipéptidos que ayudan en la producción, *por ejemplo*, el dominio IF2, dominio GST, dominio GRPE y similares. Además o como alternativa, dichos polipéptidos pueden formularse para una estabilidad mejorada. Por ejemplo, los péptidos pueden ser PEGilados, donde el grupo polietilenoxi proporciona una vida útil mejorada en el torrente sanguíneo. El polipéptido puede fusionarse a otro polipéptido para proporcionar funcionalidad adicional, *por ejemplo*, para aumentar la estabilidad *in vivo*. En general, dichas parejas de fusión son una proteína plasmática estable, que puede, *por ejemplo*, extender la semivida plasmática *in vivo* del polipéptido cuando está presente como una fusión, en particular, en donde dicha proteína plasmática estable es un dominio constante de inmunoglobulina. En la mayoría de los casos en que la proteína plasmática estable se encuentra normalmente en una forma multimérica, *por ejemplo*, inmunoglobulinas o lipoproteínas, en el que las mismas o diferentes cadenas polipeptídicas están unidas normalmente por enlaces disulfuro y/o no covalentemente para formar un polipéptido multicadena ensamblado, en el presente documento, las fusiones que contienen el polipéptido también se producirán y emplearán como un multímero que tiene sustancialmente la misma estructura que el precursor de la proteína plasmática estable. Estos multímeros serán homogéneos con respecto al agente polipeptídico que comprenden, o pueden contener más de un agente polipeptídico.

El agente polipeptídico candidato puede producirse a partir de células eucariotas, o puede producirse mediante células procariotas. Puede procesarse adicionalmente desplegándose, *por ejemplo*, por desnaturalización térmica, reducción de DTT, *etc.* y puede volverse a plegar, utilizando métodos conocidos en la técnica. Las modificaciones de interés que no alteran la secuencia primaria incluyen derivatización química de polipéptidos, *por ejemplo*, acilación, acetilación, carboxilación, amidación, *etc.* También se incluyen modificaciones de glicosilación, *por ejemplo*, las realizadas mediante la modificación de los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales; *por ejemplo*, al exponer el polipéptido a enzimas que afectan la glicosilación, tales como enzimas glucosilantes o desglucosilantes de mamífero. También se incluyen secuencias que tienen restos de aminoácidos fosforilados, *por ejemplo*, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina. Los polipéptidos pueden haberse modificado utilizando técnicas biológicas moleculares ordinarias y química sintética para mejorar su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad o para hacerlas más adecuadas como agente terapéutico. Los análogos de tales polipéptidos incluyen aquellos que contienen restos distintos de los L-aminoácidos de origen natural, *por ejemplo*, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos de origen no natural. Los D-aminoácidos pueden ser sustituidos por algunos o todos los restos de aminoácidos.

El agente polipeptídico candidato puede prepararse por síntesis *in vitro*, utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica. Hay disponibles varios aparatos de síntesis comerciales, *por ejemplo*, sintetizadores automatizados por Applied Biosystems, Inc., Beckman, *etc.* Mediante la utilización de sintetizadores, los aminoácidos de origen natural pueden sustituirse por aminoácidos no naturales. La secuencia particular y la forma de preparación se determinarán por conveniencia, economía, pureza requerida y similares. Como alternativa, el agente polipeptídico candidato puede aislarse y purificarse de acuerdo con métodos convencionales de síntesis recombinante. Puede prepararse un lisado del hospedador de expresión y el lisado purificado utilizando HPLC, cromatografía de exclusión, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad u otras técnicas de purificación. En su mayoría, las composiciones que se utilizan comprenderán al menos el 20 % en peso del producto deseado, más normalmente al menos aproximadamente el 75 % en peso, preferentemente al menos aproximadamente el 95 % en peso y, para fines terapéuticos, normalmente al menos aproximadamente el 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 la proteína total.

En algunos casos, los agentes polipeptídicos candidatos a cribar son anticuerpos. El término "anticuerpo" o "fracción de anticuerpo" pretende incluir cualquier estructura molecular que contenga cadenas polipeptídicas con una forma específica que se ajuste y reconozca un epítipo, donde una o más 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 a veces se denomina ajuste de "bloqueo y clave". La molécula de anticuerpo arquetípica es la inmunoglobulina, y todos los tipos de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, *etc.*, de todas las fuentes, *por ejemplo*, ser humano, roedor, conejo, vaca, oveja, cerdo, perro, otros mamíferos, pollo, 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 los medios en los que se cultivan las células.

Los agentes candidatos pueden obtenerse a partir de una amplia variedad de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, numerosos medios están disponibles para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos, incluyendo biomoléculas, que incluyen la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Como alternativa, las bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles o se producen fácilmente. Adicionalmente, las bibliotecas y compuestos naturales o sintéticamente producidos se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y pueden utilizarse para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidación, *etc.* para producir análogos estructurales.

Los agentes candidatos se criban para la actividad biológica mediante la administración del agente a al menos una y, normalmente, una pluralidad de muestras, a veces junto con muestras que carecen del agente. Se mide el cambio en los parámetros en respuesta al agente y se evalúa el resultado en comparación con los cultivos de referencia, *por ejemplo*, en presencia y ausencia del agente, obtenido con otros agentes, *etc.* En los casos en los que se realiza un cribado para identificar los agentes candidatos que evitarán, mitigarán o revertirán los efectos de un agente tóxico, el cribado, generalmente, se realiza en presencia del agente tóxico, donde el agente tóxico se añade en el momento más apropiado para los resultados a determinar. Por ejemplo, en los casos en los que se prueba la capacidad protectora/preventiva del agente candidato, el agente candidato se puede añadir antes del agente tóxico, simultáneamente con el agente candidato, o después del tratamiento con el agente candidato. Como otro ejemplo, en los casos en que se prueba la capacidad del agente candidato para revertir los efectos de un agente tóxico, el agente candidato se puede añadir antes del tratamiento con el agente candidato. Como se ha mencionado anteriormente, en algunos casos, la muestra es el ratón humanizado con M-CSF que se ha injertado con células, es *decir*, el agente candidato se proporciona al ratón humanizado con M-CSF que se ha injertado con células. En algunos casos, la muestra son las células a injertar, es *decir*, el agente candidato se proporciona a las células antes

del trasplante.

Si el agente candidato se va a administrar directamente al ratón, el agente se puede administrar mediante cualquiera de una serie de métodos bien conocidos en la técnica para la administración de péptidos, moléculas pequeñas y ácidos nucleicos a ratones. Por ejemplo, el agente puede administrarse por vía oral, por vía mucosa, por vía tópica, intradérmica, o por inyección, *por ejemplo*, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intravenosa o inyección intracraneal y similares. El agente puede administrarse en un tampón, o puede incorporarse en cualquiera de varias formulaciones, *por ejemplo*, por combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado. "Vehículos farmacéuticamente aceptables" pueden ser vehículos aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerados en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en mamíferos, tales como seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o transportador con el que un compuesto de la invención se formula para la administración a un mamífero. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser lípidos, *por ejemplo*, liposomas, *por ejemplo*, dendrímeros liposómicos; líquidos, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceites de cacahuete, *por ejemplo*, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, solución salina; goma de acacia, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además, se pueden utilizar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. Se pueden formular las composiciones farmacéuticas en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. El agente puede ser sistémico después de la administración o puede localizarse mediante la utilización de administración regional, administración intramural o la utilización de un implante que actúa para retener la dosis activa en el sitio de la implantación. El agente activo puede formularse para actividad inmediata o puede formularse para liberación sostenida. Para algunas afecciones, particularmente las afecciones del sistema nervioso central, puede ser necesario formular agentes para cruzar la barrera hematoencefálica (BHE). Una estrategia para el suministro de fármacos a través de la barrera del cerebro (BHE) implica la interrupción de la BHE, ya sea por medios osmóticos como el manitol o los leucotrienos, o bioquímicamente mediante la utilización de sustancias vasoactivas como la bradícina. Un agente disruptivo de la BHE puede coadministrarse con el agente cuando las composiciones se administran mediante inyección intravascular. Otras estrategias para pasar por la BHE pueden implicar la utilización de sistemas de transporte endógenos, que incluyen transcitosis mediada por Caveolin-1, transportadores mediados por portadores como portadores de glucosa y aminoácidos, transcitosis mediada por receptor para insulina o transferrina, y transportadores de eflujo activo tales 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 del vaso sanguíneo. Como alternativa, la liberación de fármacos por detrás de la BHE puede realizarse mediante liberación local, *por ejemplo*, mediante liberación intratecal, *por ejemplo*, través de un depósito de Ommaya (véanse, *por ejemplo*, las patentes de los Estados Unidos números 5.222.982 y 5385582); mediante inyección en bolo, *por ejemplo*, mediante una jeringa, *por ejemplo*, intravítreal o intracranealmente; mediante infusión, *por ejemplo*, mediante canulación, *por ejemplo*, con convección (véase, *por ejemplo*, la Solicitud de Estados Unidos N° 20070254842,); o mediante implantación de un dispositivo sobre el cual el agente se ha fijado de manera reversible (véanse, *por ejemplo*, las solicitudes de los Estados Unidos Nos. 20080081064 y 20090196903,).

Si el agente(s) candidato se proporciona a las células antes del trasplante, los agentes se añaden convenientemente en la solución o en forma fácilmente soluble, al medio de las células en cultivo. Los agentes se pueden añadir en un sistema de flujo continuo, como una corriente, intermitente o continua o, alternativamente, añadiendo un bolo del compuesto, de manera individual o incremental, a una solución de otra manera estática. En un sistema de flujo continuo, se utilizan dos fluidos, donde uno es una solución fisiológicamente neutral, y el otro es la misma solución con el compuesto de prueba añadido. El primer fluido pasa sobre las células, seguido por el segundo. En un único método de solución, se añade un bolo del compuesto de prueba al volumen del medio que rodea las células. Las concentraciones globales de los componentes del medio de cultivo no deberían cambiar significativamente con la adición del bolo, o entre las dos soluciones en un método de flujo continuo.

Se puede realizar una pluralidad de ensayos en paralelo con diferentes concentraciones del agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Como se conoce en la técnica, la determinación de la concentración eficaz de un agente normalmente utiliza un intervalo de concentraciones resultantes de diluciones 1:10 u otras escalas logarítmicas. Las concentraciones pueden refinarse aún más con una segunda serie de diluciones, si es necesario. Por lo general, una de estas concentraciones sirve como un control negativo, *es decir*, a una concentración cero o por debajo del nivel de detección del agente o a o por debajo de la concentración del agente que no produce un cambio detectable en el fenotipo.

Puede realizarse un análisis de la respuesta de las células en el ratón humanizado con M-CSF al agente candidato en cualquier momento después del tratamiento con el agente. Por ejemplo, las células pueden analizarse 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, por ejemplo, 2 meses, 4 meses, 6 meses o más. En algunos ejemplos, el análisis comprende análisis en múltiples puntos de tiempo. La selección del punto(s) de tiempo para el análisis se basará en el tipo de análisis que se realizará, tal como entenderá fácilmente el experto en la técnica.

El análisis puede comprender medir cualquiera de los parámetros descritos en el presente documento o conocidos en la técnica para medir la viabilidad celular, proliferación celular, identidad celular, morfología celular y función celular, particularmente porque pueden pertenecer a células de las células inmunitarias. Por ejemplo, la citometría de flujo puede utilizarse para determinar el número total de células hematopoyéticas o el número de células de un tipo de célula hematopoyética particular. Puede realizarse histoquímica o inmunohistoquímica para determinar el estado apoptótico de las células, *por ejemplo*, marcado del extremo libre por desoxinucleotidil transferasa terminal dUTP (TUNEL, del inglés, "transferase dUTP nick end labeling") para medir la fragmentación del ADN o inmunohistoquímica para detectar anexina V que se une a la fosfatidilserina en la superficie celular. La citometría de flujo también puede emplearse para evaluar las proporciones de células diferenciadas y tipos de células diferenciadas, *por ejemplo*, para determinar la capacidad de las células hematopoyéticas para diferenciarse en presencia del agente. Se pueden realizar ELISA, transferencias de Western y Northern para determinar los niveles de citoquinas, quimiocinas, inmunoglobulinas, *etc.* expresadas en los ratones humanizados con M-CSF injertados, *por ejemplo*, para evaluar la función de las células injertadas. También pueden realizarse ensayos *in vivo* para probar la función de las células inmunitarias, así como ensayos relevantes para enfermedades particulares o trastornos de interés tales como diabetes, enfermedad autoinmune, enfermedad de injerto contra huésped, AMD, *etc.* Véase, *por ejemplo*, Current Protocols in Immunology (Richard Coico, ed. John Wiley & Sons, Inc. 2012) y Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997).

Por lo tanto, *por ejemplo*, se proporciona un método para determinar el efecto de un agente en un patógeno humano, que comprende la exposición de un ratón humanizado con M-CSF injertado, *por ejemplo*, un ratón *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado, a una cantidad eficaz de un patógeno humano, siendo la cantidad eficaz de un patógeno la cantidad de patógeno requerida para producir una infección en el ratón; que permite al patógeno infectar al ratón; que mide un parámetro de la infección a lo largo del tiempo en presencia del agente; y que compara esa medida con la medida de un ratón humanizado con M-CSF injertado no expuesto al agente. Se determina que el agente es antipatógeno, *por ejemplo*, anti-*S. typhi*, si el agente reduce la cantidad del agente en sangre o un tejido del ratón al menos la mitad después de una sola administración o dos o más administraciones del agente durante un periodo de tiempo seleccionado.

Como otro ejemplo, se proporciona un método para determinar si un aislado o cepa de patógeno de interés es resistente a los fármacos, *por ejemplo*, resistente a múltiples fármacos. En estos métodos, un ratón humanizado con M-CSF injertado, *por ejemplo*, un ratón *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> hM-CSF* injertado, se expone a una cantidad eficaz de un aislado o cepa de patógeno humano de interés, siendo la cantidad eficaz del patógeno la cantidad de patógeno requerida para producir una infección en el ratón; el patógeno permite infectar al ratón; un parámetro de la infección, *por ejemplo*, el título del aislado o cepa de interés en la sangre o tejido del ratón, la capacidad del aislado o cepa de interés para mantener una infección en el ratón, o la capacidad del aislado o cepa de interés para reproducirse en el ratón en un punto en el tiempo después de la administración del fármaco, se mide en presencia del fármaco; y esa medición se compara con la medición de un ratón humanizado con M-CSF injertado infectado con un patógeno no expuesto al agente. Los ejemplos de fármacos de interés incluyen amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cloranfenicol, ciprofloxacina, cotrimoxazol, ertapenem, imipenem, fluoroquinolonas (*por ejemplo*, ciprofloxacina, gatifloxacina, ofloxacina), estreptomina, sulfadiazina, sulfametoxazol, tetraciclina y una combinación de los mismos. En un ejemplo específico, la administración del fármaco o combinación de fármacos es de al menos una semana, 10 días, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas después de una exposición productora de la infección al aislado o cepa de interés.

Se proporcionan otros ejemplos de usos para los ratones en cuestión en otra parte del presente documento. Aplicaciones adicionales de los ratones genéticamente modificados e injertados descritos en esta divulgación serán evidentes para los expertos en la técnica tras leer esta divulgación.

#### REACTIVOS, DISPOSITIVOS Y KITS

También se describen reactivos, dispositivos y kits de los mismos para practicar uno o más de los métodos descritos anteriormente. Los reactivos, dispositivos y kits de los mismos pueden variar mucho.

En algunos ejemplos, los reactivos o kits comprenderán uno o más agentes para su uso en los métodos descritos. Por ejemplo, el kit puede comprender un ratón humanizado con M-CSF. El kit puede comprender reactivos para la cría de ratones humanizados con M-CSF, *por ejemplo*, cebadores y, en algunos casos, reactivos para la genotipificación de ratones humanizados con M-CSF. El kit puede comprender células hematopoyéticas humanas o una población enriquecida de células progenitoras hematopoyéticas humanas para el trasplante en el ratón humanizado con M-CSF, o reactivos para preparar una población de células hematopoyéticas o una población enriquecida de células hematopoyéticas de un ser humano para el trasplante en un ratón humanizado con M-CSF. Otros reactivos pueden incluir reactivos para determinar la viabilidad y/o función de las células hematopoyéticas, *por ejemplo*, en presencia/ausencia del agente candidato, *por ejemplo*, uno o más anticuerpos que son específicos para marcadores expresados por diferentes tipos de células hematopoyéticas o reactivos para detectar citoquinas particulares, quimiocinas, *etc.* Otros reactivos pueden incluir medios de cultivo, suplementos de cultivo, composiciones de matriz o similares.

Además de los componentes anteriores, los presentes kits incluirán adicionalmente instrucciones para poner en práctica los presentes métodos. Estas instrucciones pueden estar presentes en los presentes kits en diversas de formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que pueden estar presentes estas instrucciones es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, por ejemplo, uno o más trozos de papel en los que se imprime la información, en el empaquetado del kit, en un prospecto, etc. Sin embargo, otro medio sería un medio legible por ordenador, por ejemplo, disquete, CD, etc., en el que se ha registrado la información. Otro medio que puede estar presente es la dirección de un sitio web que puede utilizarse a través de Internet para acceder a la información en un sitio eliminado. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y una descripción completas de cómo hacer y utilizar la presente invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención ni tienen la intención de representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es la atmosférica o próxima a esta.

El factor 1 estimulante de colonias (CSF-1) o el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, del inglés "Macrophage Colony Stimulating Factor") es una de las primeras citoquinas que se descubrió para promover la hematopoyesis. En el sistema hematopoyético, se cree que el M-CSF actúa específicamente sobre los progenitores mieloides, a partir de la etapa del progenitor mielóide común (PMC) y para favorecer la diferenciación de los PMC en el linaje monocito/macrófago (Sherr, C.J. et al. (1988) Macrophage colony-stimulating factor, CSF-1, and its proto-oncogene-encoded receptor, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 53 Pt 1:521-530). Además, el M-CSF es necesario para la supervivencia, la adhesión y la motilidad de los macrófagos (Pixley, F.J., and Stanley, E.R. (2004) CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action, Trends Cell Biol. 14:628-638; Socolovsky, M. et al. (1998) Cytokines in hematopoiesis: specificity and redundancy in receptor function, Adv. Protein Chem. 52:141-198; Stanley, E.R. et al. (1997) Biology and action of colony--stimulating factor-1, Mol. Reprod. Dev. 1997, 46, 4-10). Además de su papel clave en la diferenciación mielóide, el M-CSF es vital para la diferenciación de osteoclastos, para la diferenciación, supervivencia y proliferación de las células del tracto reproductivo femenino, y para la formación de placenta (Pixley *et al.* (2004); Socolovsky *et al.* (1998); Stanley *et al.* (1997)). El M-CSF lo producen varias células que incluyen fibroblastos, células del estroma de médula ósea (MO), macrófagos y linfocitos T activados y células epiteliales secretoras. Las señales del M-CSF a través del receptor del M-CSF (Fms; CD115) y la ligadura de su receptor por el M-CSF dan como resultado la fosforilación de tirosina de Fms y la posterior fosforilación de varias proteínas de células hospedadoras, tales como Grb2, Shc, Sos1 y p85 (Pixley *et al.* (2004); Stanley *et al.* (1997); Rohrschneider, L.R. et al. (1997) Growth and differentiation signals regulated by the M-CSF receptor, Mol. Reprod. Dev. 46:96-103; Yeung, Y.G. y Stanley, E.R. (2003) Proteomic approaches to the analysis of early events in colony-stimulating factor-1 signal transduction, Mol. Cell. Proteomics 2: 1143-1155).

Los inventores plantearon la hipótesis de que la diferenciación mielóide humana defectuosa en los ratones humanizados podría deberse a la falta de señales específicas que promuevan la diferenciación mielóide. Para validar esto, los inventores diseñaron una nueva generación de ratones humanizados para secretar el M-CSF humano a niveles fisiológicos a partir de los tejidos apropiados. El análisis de estos ratones humanizados con M-CSF reveló una expresión normal, tanto cualitativa como cuantitativamente, del M-CSF humano. El análisis de ratones humanizados con M-CSF injertados con células CD34<sup>+</sup> humanas indicó frecuencias aumentadas de monocitos/macrófagos humanos en diversos tejidos. Además, los monocitos/macrófagos humanos obtenidos a partir de estos ratones exhibieron propiedades funcionales mejoradas.

Los ratones humanizados con M-CSF descritos en el presente documento muestran frecuencias y funciones aumentadas de células mieloides humanas. La inserción del M-CSF humano en el locus M-CSF de ratón de ratones Balb/c deficientes en la recombinación que activa el gen 2 (Rag2; número de acceso Genbank 1.NM\_009020.3) y la cadena gamma ( $\gamma$ c, también conocida como "cadena gamma del receptor de interleuquina 2" o IL2RG; número de acceso Genbank 1.NM\_013563.3) (ratones Balb/c  $Rag2^{-/y}c^{-/}$ ) dieron como resultado la expresión fiel del M-CSF humano en estos ratones tanto cualitativa como cuantitativamente. La transferencia intrahepática de células madre y progenitoras hematopoyéticas derivadas del hígado fetal humano (CD34<sup>+</sup>) en ratones recién nacidos humanizados con M-CSF (M-CSF<sup>h/h</sup>) da como resultado una diferenciación más eficaz y frecuencias mejoradas de monocitos/macrófagos humanos en la médula ósea, bazo y sangre periférica. Además, los ratones M-CSF<sup>h/h</sup> exhibieron habilidades sostenidas para apoyar la diferenciación de monocitos/macrófagos humanos incluso después de 20 semanas del trasplante. Además, Los ratones M-CSF<sup>h/h</sup> contienen monocitos/macrófagos humanos residentes dentro de diversos tejidos, incluyendo hígado y pulmones, a diferencia de los ratones control no modificados. Los monocitos/macrófagos humanos obtenidos de los ratones humanizados con M-CSF también muestran propiedades funcionales aumentadas tales como migración, fagocitosis, activación y repuestas al LPS.

**Ejemplo 1: Preparaciones celulares, métodos analíticos y ensayos**

**de aislamiento y trasplante de células CD34<sup>+</sup>.** Se obtuvieron muestras de hígado fetal humano del depósito de tejido hepático fetal humano en la Facultad de Medicina Albert Einstein, Bronx, NY y de los recursos de Advance Biosciences, Inc., Alameda, CA. Todos los experimentos con tejidos humanos se realizaron con la aprobación del Comité de Investigaciones Humanas de Yale.

Para aislar células CD34<sup>+</sup> humanas, se enjuagaron las muestras de hígado fetal una vez con PBS y se cortaron en trozos pequeños, se trataron con colagenasa D (100 ng/ml) a 37 °C durante 45 minutos. Se prepararon suspensiones de células individuales y se aislaron las células mononucleares utilizando centrifugación en gradiente de densidad (medio de separación de linfocitos, MP biomédicas). Se aislaron las células CD34<sup>+</sup> después de tratar las células con microperlas antiCD34 humanas seguido de la técnica MACS™ (Miltenyi Biotech).

Para el trasplante, se irradiaron subletalmente los cachorros recién nacidos (de 1 día de edad) con dos dosis separadas (2x150 cGy) con 4 horas de separación y se inyectaron 1x10<sup>5</sup> a 2x10<sup>5</sup> células CD34<sup>+</sup> humanas purificadas en 20 ul de PBS en el hígado utilizando una aguja de calibre 22 (Hamilton Company, Reno, NV).

**Aislamiento y cultivo de células del estroma mesenquimales (CEM).** Se aislaron los huesos largos de los ratones y se eliminaron las células de la MO. Se cortaron los huesos en trozos y se digirieron con un cóctel de colagenasa D y P (25 ng/ml) durante 45 minutos a 37 °C. Se aislaron las células en suspensión y se colocaron en placas en presencia de medio de cultivo de CEM (Stem Cell Technologies). Después de 2 semanas del cultivo, se aislaron y cultivaron las células CD45<sup>+</sup>Sca1+CD90<sup>+</sup>.

**Anticuerpos y citometría de flujo.** Se analizaron las suspensiones de células individuales mediante citometría de flujo utilizando el software FACS Calibur o LSRII y CELLQUEST™, el software FACS DIVA™ (BD Biosciences, San José, CA) o el software FLOWJO™ (Tree Star, Inc., Ashland, OR), respectivamente. Se realizó la clasificación celular de subpoblaciones definidas utilizando un clasificador de células FACS ARIA™ (BD Biosciences, San José, CA).

Los siguientes anticuerpos humanos se utilizaron en el estudio: CD11b, CD14, CD33, CD34, CD38, CD40, CD45, CD80, CD86, CD90 y HLA-DR.

Los siguientes anticuerpos de ratón se utilizaron en este estudio: CD11b, CD40, CD45, CD80, CD86, F4/80, Gr1, H2K<sup>d</sup> y IA<sup>d</sup>.

**Cultivo celular.** Para la diferenciación de macrófagos murinos, se sembraron las células de MO en placas de 6 pocillos en presencia de DMEM con FCS al 10 % y complementos necesarios (L-glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina al 1 % y aminoácidos no esenciales 1 mM). Se trataron las células con el M-CSF murino recombinante (10 ng/ml) o el M-CSF humano recombinante (10 ng/ml) durante 7 días. Se eliminó el sobrenadante del cultivo celular cada tres días y se reemplazó el cultivo por medio nuevo y citoquinas.

Para estudios de macrófagos humanos, tales como activación, fagocitosis y migración, se clasificaron y cultivaron *in vitro* 2x10<sup>5</sup> células CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> del bazo en el DMEM con suero AB humano al 15 % y complementos necesarios (L-glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina al 1 % y aminoácidos no esenciales 1 mM).

**Ensayos de activación, fagocitosis y migración.** Para la estimulación *in vivo* con LPS, se inyectó a los ratones *i.p.* con LPS (100 ng/g de peso corporal). Para la estimulación *in vitro* con LPS, se añadió LPS (10 ng/ml) a las células y se cultivaron durante 1 o 2 días. Para la estimulación *in vitro* con poli I:C, se cultivaron las células en presencia de poli I:C (10 µg/ml) durante 6 o 12 horas.

El ensayo de fagocitosis se realizó utilizando el kit de ensayo de fagocitosis VYBRANT™ disponible comercialmente (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los ensayos de migración se realizaron utilizando un kit de ensayo de migración celular de quimiotaxis QCM™ comercialmente disponible (Millipore) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**Extracción de ARN y PCR en tiempo real.** Se aisló el ARN total utilizando sistemas de kit comercialmente disponibles (RNEASY™ Mini kit, Qiagen). Se sintetizó ADNc utilizando el cebador oligo dT y se expandió la transcriptasa inversa (Roche). La reacción de PCR se realizó por duplicado utilizando sistemas de PCR 7500 en tiempo real y mezcla maestra de PCR power SYBR™ Green (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando los siguientes pares de cebadores específicos de genes: CSF1 humano (en sentido: 5'-TACTGTAGCCACATGATTGGGA-3' (SEQ ID NO:1) y antisentido: 5'-CCTGTGTCAGTCAAAGGAAC-3' (SEQ ID NO:2)), CSF1 de ratón (en sentido: 5'-CGACATGGCTGGGCTCCC-3' (SEQ ID NO:3) y antisentido: 5'-CGCATGGTCTCATCTATTAT-3' (SEQ ID NO:4)), IFNα humano (en sentido: 5'-GTACTGCAGAATCTCTCCTTCTCCTG-3' (SEQ ID NO:5) y antisentido: 5'-GTGTCTAGATCTGACAACCTCCCAGGCACA-3' (SEQ ID NO:6)), IFNβ humano (en sentido: 5'-

TTGTGCTTCTCCACTACAGC-3' (SEQ ID NO:7) y antisentido: 5'-CTGTAAGTCTGTTAATGAAG-3' (SEQ ID NO:8)), Cebadores HPRT de ratón (en sentido: 5'-AAGGACCTCTCGAAGTGTGGATA (SEQ ID NO:9) y antisentido: 5'-CATTAAAAGGAAGTGTGACAACG-3' (SEQ ID NO:10)) cebadores HPRT humanos (en sentido: 5'-CTTCCTCCTCCTGAGGAGTC-3' (SEQ ID NO:11) y antisentido: 5'-CCTGACCAAGGAAAGCAAAG-3' (SEQ ID NO:12)). Para PCR normal, se extrajo el ADN de las células diana utilizando un kit comercialmente disponible (kit de sangre y tejido DNEASY™, Qiagen) y se realizó el análisis de PCR utilizando pares de cebadores específicos de genes.

**ELISA.** Para estudios de cuantificación de citoquinas, se recogieron sobrenadantes de suero sanguíneo o de cultivo celular y se sometieron a ELISA utilizando kits de TNF ELISA humano e IL6 humano comercialmente disponibles (Ray Biotech, Inc., GA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**Histología.** Se fijaron los órganos sólidos en PFA al 4%. Se incluyeron los órganos fijos en parafina (Blue RibBion; Surgipath Medical Industries). Se seccionaron los bloques y se tiñeron las secciones de 5 µm con tinción H&E, seguido de la colocación de cubreobjetos por métodos rutinarios. Se mantuvieron las secciones sin ningún medio. Se registraron imágenes microscópicas de luz digital, a temperatura ambiente, con un microscopio Zeiss Axio Imager.A1 (con lentes de objetivo 2x y 10x), cámara AxioCam MRc5 y software de imágenes AxioVision 4.7.1 (Carl Zeiss Microimaging LLC).

**Análisis estadístico.** Los datos se presentan como la media ± EEM. Se evaluó la significancia estadística utilizando una prueba *t* de Student de 2 lados. Los valores  $P > 0,05$  se consideraron no significativos y los valores  $P < 0,05$  se representaron como \*.

## Ejemplo 2: Ratones genéticamente modificados para injerto

**Estrategia Knockin del M-CSF humano.** Se preparó una construcción dirigida para reemplazar la secuencia de ácido nucleico del M-CSF de ratón con la secuencia de ácido nucleico del M-CSF humano (identificación de alelo VELOCIGENE® número 5093) en una única etapa de direccionamiento utilizando tecnología VELOCIGENE® como se describió previamente (Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nat. Biotechnol. 21:652-659). Se obtuvieron ADN del M-CSF de ratón y humano a partir del cromosoma artificial bacteriano (BAC) RPCI-23, clon 373B18 y de BAC RPCI-11, clon 101M23, respectivamente. En resumen, una construcción de dirección linealizada generada por clonación de reparación de huecos que contiene grupos de homología cadena arriba y abajo del M-CSF de ratón que flanquean una secuencia del M-CSF humano de 17,5 kb que se extiende desde el exón 2 hasta 633nt cadena abajo del exón 9 no codificante, y se electropora un casete de selección de fármaco flojo en células madre embrionarias (ME) de ratón RAG2<sup>+/+</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup>, que se fabricaron a partir de una línea celular ME V17 comercialmente disponible (BALB/c x 129 F1). Las células ME de ratón que portaban una delección heterocigótica del gen M-CSF se identificaron mediante el cribado de pérdida de alelo con 2 ensayos de qPCR TaqMan que reconocían las secuencias en el intrón 2 (cebador TUF, 5'-CCAGGAATGTCCACTATGGATTC-3' (SEQ ID NO: 13); sonda TUP, 5' ACTGCTCCTTGACCCTGCTCTGACTCA-3' (SEQ ID NO:14); cebador TUR, 5'-TGGGCTGACTTCCCAAAGG-3' (SEQ ID NO:15)) y en la secuencia flanqueante 3' (cebador TDF, 5'-TTAGGTGCTAGTAGGCTGGAAAGTG-3' (SEQ ID NO:16); sonda TDP, 5'-TGCAATCGCAGCTTCTCCTTACTAGGCT-3' (SEQ ID NO:17); cebador TDR, 5'-AATAGGAAGAACAACAGGTCTAATACC-3' (SEQ ID NO:18)) del gen CSF1 de ratón. La sustitución simultánea del gen de ratón con el gen CSF1 humano se confirmó mediante ensayos TaqMan de ganancia de alelo que detectaron una copia de una secuencia en el intrón 2 del CSF1 (cebador directo, 5'-GCTGCTTGCCTGGGTTAGTG-3' (SEQ ID NO: 19); sonda, 5'-TGCCCAGGAACATCAACCACTGATTCTG-3' (SEQ ID NO:20); cebador inverso, 5'-GAGGGACAGCAGACCTCAGAAAG-3' (SEQ ID NO: 21) y una copia del casete de resistencia a neomicina (neor) (cebador directo, 5'-GGTGGAGAGGCTATTTCGGC-3' (SEQ ID NO: 22); sonda, 5'-TGGGCACAACAGACAATCGGCTG-3' (SEQ ID NO:23); cebador inverso, 5'-GAACACGGCGGCATCAG-3' (SEQ ID NO:24); véase la figura 8. El ensayo qPCR que reconoce la secuencia del CSF1 no amplifica el ADN del genoma del ratón. Se utilizaron los mismos ensayos para confirmar los genotipos de ratones derivados de las células ME diana. La escisión mediada por cre del casete de selección de fármacos se confirmó con el ensayo *neor* TaqMan. Todos los conjuntos de cebador-sonda fueron suministrados por Biosearch Technologies. Las sondas se marcaron con 6-carboxi-fluoresceína (FAM) en sus extremos 5' y BHQ-1 en sus extremos 3'.

Las células ME correctamente dirigidas se electroporaron adicionalmente con un vector transitorio que expresa Cre para eliminar el casete de selección de fármaco. Se introdujeron clones de células ME dirigidas sin casete de fármaco en un embrión de ratón de fase celular 8 mediante el método VELOCIMOUSE® (Poueymirou et al., (2007)). Se identificaron VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ME donante) que portaban el gen M-CSF humanizado (VG 5093) por genotipado para pérdida de alelo de ratón y ganancia de alelo humano utilizando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela et al. 2003)).



**Mantenimiento del ratón.** Los ratones Balb/c-Rag2<sup>-/-</sup> γc<sup>-/-</sup>M-CSF<sup>m/m</sup>, Balb/c-Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>M-CSF<sup>h/m</sup> y Balb/c-Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>M-CSF<sup>h/h</sup> se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos en las instalaciones de cuidados de animales de la Universidad de Yale. Todos los experimentos con ratones fueron aprobados por el comité institucional de cuidado y uso de animales de la Universidad de Yale.

5 **Fabricación de ratones humanizados con M-CSF.** Para validar si la expresión fisiológica del M-CSF humano en un ratón da como resultado una diferenciación mejorada de macrófagos humanos en los ratones humanizados, los ratones Balb/c Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> se diseñaron para expresar el M-CSF humano. La cepa Balb/c con deficiencia de Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> sirve como sistema modelo exitoso para el estudio del sistema inmune humano en ratones (Traggiai E et al. (2004) Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice, Science 304:104-107). Con el fin de evitar la expresión supra-fisiológica del M-CSF humano en estos ratones, se adoptó una estrategia para reemplazar la secuencia de codificación del M-CSF de ratón con la contraparte humana. Una construcción (Figura 8) para reemplazar, en una única etapa de direccionamiento, se construyó la mayoría del marco de lectura abierto del M-CSF con secuencia de codificación del M-CSF humano (Identificación de Alelo VELOCIGENE® Número 5093), utilizando la tecnología VELOCIGENE® como se describió previamente (Valenzuela et al., (2003)). Cabe destacar que, el promotor y otros elementos reguladores (tales como 5'UTR) del ratón se conservaron en este vector. El vector de direccionamiento linealizado se sometió a electroporación en las células madre embrionarias Balb/c x 129 Rag2<sup>+/-</sup>γc<sup>-/-</sup>. Las células ME correctamente dirigidas se electroporaron adicionalmente con un vector transitorio que expresa Cre para eliminar el casete de selección de fármaco. Se introdujeron clones de células ME dirigidas sin casete de fármaco en un embrión de ratón de fase celular 8 mediante el método VELOCIMOUSE® (Poueymirou et al., (2007)). Se identificaron VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ME donante) que portaban el gen M-CSF humanizado (VG 5093) por genotipado para la pérdida del alelo de ratón y ganancia del alelo humano utilizando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela et al. 2003)). A través del entrecruzamiento secuencial de progenies, se generaron ratones quiméricos Balb/c Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> y ratones transmitidos por línea germinal con el M-CSF de ratón y humano (M-CSF<sup>m/h</sup>; knockin heterocigoto) y solo el M-CSF humano (M-CSF<sup>h/h</sup>; knockin homocigoto).

30 **Caracterización de ratones humanizados con M-CSF.** Se evaluó la expresión del M-CSF humano en los ratones humanizados con M-CSF. Se recogieron y se analizaron los órganos de ratones M-CSF<sup>m/m</sup> o M-CSF<sup>h/h</sup> para la expresión del ARNm del M-CSF murino y humano utilizando cebadores que son específicos de especie. Tal como se muestra en las **figuras 1A y 1B**, el M-CSF se expresa en la mayoría de los órganos analizados, incluido MO, bazo, sangre, hígado, cerebro, pulmón, testículos y riñones. Sin embargo, el timo y la piel no mostraron expresión detectable del M-CSF. Cabe destacar que, el patrón de expresión del M-CSF de ratón y humano fue comparable entre ratones M-CSF<sup>m/m</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup>, respectivamente. A continuación, se cuantificaron los niveles de expresión del M-CSF de ratón y humano en ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, M-CSF<sup>m/h</sup>, y M-CSF<sup>h/h</sup>. Se aislaron células del estroma mesenquimal de médula ósea (CEM) y se cuantificaron los niveles de expresión de ARNm del M-CSF utilizando PCR en tiempo real (**Figura 1C**) y se cuantificó la proteína del M-CSF (secretada) utilizando ELISA (**Figura 1D**). Los ratones M-CSF<sup>m/m</sup> expresaron solo el M-CSF de ratón, los ratones M-CSF<sup>m/h</sup> expresaron el M-CSF de ratón y humano y los ratones M-CSF<sup>h/h</sup> expresaron solo el M-CSF humano. Los niveles de expresión del M-CSF humano fueron comparables con el M-CSF de ratón. De acuerdo con estos datos, el análisis del CSF-1 en suero reveló niveles de expresión comparables de proteína del CSF-1 en ratones m/m, h/m y h/h (**Figura 1E**). La hemicigosidad no conduce a la disminución de los niveles de expresión de genes y proteínas, lo que indica que los niveles de dosificación de genes parecen no ser limitantes para esta citoquina.

45 Para investigar si la sustitución del M-CSF de ratón con el M-CSF humano da como resultado efectos perjudiciales, especialmente sobre el hueso y la hematopoyesis, se analizaron ratones M-CSF<sup>h/h</sup> a diversas edades. Estudios previos han documentado que los ratones con señalización defectuosa del M-CSF (Csf1<sup>op/op</sup> y Csf1r<sup>-/-</sup>) presentan insuficiencia de erupción dental y defectos óseos (Dai, X.M. et al. (2002) Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects, Blood 99:111-120; Felix, R. et al. (1990) Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse, Endocrinology 127:2592-2594; Wiktor-Jedrzejczak, W. et al. (1990) Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse, Proc. Natl Acad. Sci. USA 87:4828-4832; Yoshida, H. et al. (1990) The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene, Nature 345:442-444). Por el contrario, ratones M-CSF<sup>h/h</sup> revelaron dientes y propiedades óseas normales. Además, a diferencia de los ratones Csf1<sup>op/op</sup> and Csf1r<sup>-/-</sup>, el contenido celular total de la MO (**Figura 2A**), las frecuencias de células mieloides en la MO, bazo (BA) y sangre periférica (SP) (**Figura 2B**) y las frecuencias de macrófagos en la MO y BA (**Figura 2C**) fueron comparables entre ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, M-CSF<sup>m/h</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup>. En línea con esta observación, las frecuencias del compartimento de CMH (incluyendo CMH a largo plazo, CMH a corto plazo y progenitores multipotentes) y el compartimento progenitor mieloides (incluyendo progenitores mieloides comunes, progenitores de monocitos de granulocitos y progenitores de eritrocitos megacariocitos) fueron comparables entre ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, M-CSF<sup>h/m</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup> (**Figura 9**).

65 Una posible explicación para la hematopoyesis normal y el desarrollo óseo en los ratones M-CSF<sup>h/h</sup> podría ser que el M-CSF humano es reactivo de forma cruzada con células de ratón. Para validar esto, se aislaron las células de MO totales del M-CSF<sup>m/m</sup> y se cultivaron en presencia del M-CSF murino recombinante o el M-CSF humano

recombinante. Mientras que las células de MO cultivadas en ausencia de citoquina no lograron sobrevivir, las células cultivadas en presencia del M-CSF humano o de ratón mostraron niveles comparables de diferenciación *in vitro* (**Figura 2D**). El análisis de estos macrófagos diferenciados *in vitro* para la expresión de moléculas coestimuladoras y MHC indicó niveles comparables de estas moléculas en presencia del M-CSF humano o de ratón (**Figura 2E**). De acuerdo con estos hallazgos, estudios previos documentaron que el M-CSF humano es activo en células diana de ratón, mientras que el M-CSF de ratón no tiene reactividad cruzada con células humanas (Sieff, C.A. (1987) Hematopoietic growth factors, J. Clin. Invest. 79:1549-1557).

### Ejemplo 3: Diferenciación de monocitos/macrófagos humanos en ratones humanizados con M-CSF

Para evaluar el impacto de la humanización del M-CSF, se trasplantaron intrahepáticamente (*i.h*) cachorros Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>M-CSF<sup>m/m</sup>, Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>M-CSF<sup>h/m</sup> y Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>M-CSF<sup>h/h</sup> recién nacidos irradiados subletalmente con ~ 2x10<sup>5</sup> células CD34<sup>+</sup> de hígado fetal humano purificadas. Los receptores se sangraron a las 8 semanas después del trasplante para confirmar las células de origen del donante (basándose en la expresión de CD45 humanas). Doce semanas después del trasplante, se sacrificaron los receptores y se recogieron su MO, BA y SP. El análisis reveló el aumento de las frecuencias relativas y absolutas de células de linaje de monocitos/macrófagos CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en la MO, BA y SP en ratones M-CSF<sup>h/m</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup> en comparación con ratones M-CSF<sup>m/m</sup> (**Figuras 3A-C**). Aunque los ratones M-CSF<sup>h/m</sup> exhibieron frecuencias aumentadas de células CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>, se encontraron las frecuencias máximas de células CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en los ratones M-CSF<sup>h/h</sup>. Curiosamente, además de este aumento, las frecuencias de células CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> también se incrementaron en la MO, BA y SP en ratones M-CSF<sup>h/m</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup> (**Figura 3A**).

Para analizar si los ratones knockin M-CSF humanos apoyan la mielopoyesis humana sostenida, se analizaron los receptores a las 12, 16 y 20 semanas después del trasplante. Mientras que las células de linaje de monocitos/macrófagos CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> humanas se redujeron ligeramente a las 16 semanas y se redujeron altamente después de 20 semanas del trasplante en los ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, se observaron proporciones significativas de células CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> humanas en ratones M-CSF<sup>h/m</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup> incluso a las 16 y 20 semanas. No obstante, se observaron las frecuencias máximas de células CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> humanas en los ratones M-CSF<sup>h/h</sup> (**Figuras 4A y 4B**).

A continuación, se evaluó si los ratones humanizados con M-CSF soportan la diferenciación eficaz de los macrófagos de tejido humano. Para este fin, se perfundieron ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, M-CSF<sup>m/h</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup> con PBS y se recogieron sus órganos (incluyendo hígado, pulmones y piel). Se obtuvieron las células del peritoneo lavando la cavidad peritoneal con PBS. Se prepararon suspensiones de células individuales y se calcularon las frecuencias de células CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> humanas. Como cabía esperar, las frecuencias de células CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> humanas se incrementaron significativamente en el hígado, pulmones y peritoneo en ratones M-CSF<sup>m/h</sup> y M-CSF<sup>h/h</sup>. Sin embargo, el análisis de explantes de piel reveló frecuencias comparables de células CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> humanas entre ratones M-CSF<sup>m/m</sup> y M-CSF<sup>m/h</sup>, aunque se observó un aumento significativo de estas células en explantes de piel de ratones M-CSF<sup>h/h</sup> (**Figura 5**). En conjunto, estos datos sugieren que la expresión del M-CSF humano en ratones mejora la diferenciación del linaje mielóide/macrófago de las CMH humanas.

### Ejemplo 4: Función de monocitos/macrófagos humanos en ratones humanizados con M-CSF

Para investigar si los monocitos/macrófagos CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> humanos en los ratones humanizados con M-CSF funcionaban normalmente, se realizaron estudios funcionales tanto *in vivo* como *in vitro*. Se inyectaron cachorros M-CSF<sup>m/m</sup> y M-CSF<sup>m/h</sup> irradiados subletalmente con células CD34<sup>+</sup> de hígado fetal y 12 semanas después del trasplante, se evaluó la hematopoyesis derivada del donante y los ratones receptores se inyectaron con LPS o PBS. Dos días después de la inyección de LPS, se analizaron los receptores para las frecuencias de las células CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> humanas en el bazo. Mientras que la inyección de LPS inducía solo un modesto aumento de las células del linaje monocito/macrófago en los ratones M-CSF<sup>m/m</sup>, cuando se comparaba con los grupos inyectados con PBS, los ratones M-CSF<sup>m/h</sup> inyectados con LPS mostraban un aumento de varias veces de células CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> humanas en el bazo (**Figura 6A**). A continuación, se examinaron las capacidades de estas células para producir citoquinas proinflamatorias en respuesta a la estimulación *in vivo* de LPS.

Se inyectaron ratones M-CSF<sup>m/m</sup> y M-CSF<sup>m/h</sup> inyectados con células CD34<sup>+</sup> humanas con LPS. Seis horas después de la inyección, se sangraron los ratones y se determinaron los niveles de suero de IL6 y TNF-α humano y de ratón mediante ELISA. De acuerdo con las frecuencias incrementadas de monocitos/macrófagos en los ratones humanizados con M-CSF, se detectaron niveles elevados de IL6 y TNFα humanos en los ratones M-CSF<sup>m/h</sup>. Aunque los niveles basales de estas citoquinas fueron mayores en los ratones M-CSF<sup>m/h</sup>, la estimulación con LPS dio como resultado niveles aumentados de IL6 y TNFα humanos en el suero (**Figuras 6B y 6C**). A continuación, se analizó la capacidad de monocitos/macrófagos (obtenidos a partir de ratones humanizados con M-CSF) para secretar citoquinas proinflamatorias *in vitro*. Se aislaron células CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> humanas de los bazos de ratones M-CSF<sup>m/m</sup> o M-CSF<sup>h/h</sup>, después de 12 semanas de reconstitución con células CD34<sup>+</sup> humanas, y se estimularon con LPS *in vitro* durante 24 o 48 horas. Se evaluaron los niveles de citoquinas IL-6 y TNFα en los sobrenadantes del cultivo celular mediante ELISA. En línea con los datos *in vivo*, las células CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> purificadas a partir de ratones M-CSF<sup>h/h</sup> secretaron niveles aumentados de estas citoquinas en respuesta a LPS (**Figuras 7A y 7B**). De manera similar, las células CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> humanas aisladas de ratones humanizados con M-CSF expresaron niveles aumentados de ARNm de interferón-α e interferón-β en respuesta a la estimulación con poli I:C (**Figura 7C**). Finalmente, se

analizaron las propiedades de fagocitosis, migración y activación de monocitos/macrófagos humanos obtenidos a partir de ratones humanizados con M-CSF. Las células humanas CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> purificadas a partir de ratones M-CSF<sup>h/h</sup> reconstituidos con CD34<sup>+</sup> humanas exhibieron propiedades fagocíticas aumentadas (**Figura 7D**) y exhibieron quimiotaxis aumentada en respuesta a la quimioquina Mip3β (**Figura 7E**). Como cabía esperar, los monocitos/macrófagos humanos obtenidos de los ratones M-CSF<sup>h/h</sup> mostraron propiedades de activación mejoradas según se evaluó basándose en la regulación positiva de moléculas coestimuladoras que incluyen CD40, CD80 y CD86, y HLA-DR en respuesta a la estimulación de LPS *in-vitro* (**Figura 7F**). En su conjunto, los monocitos/macrófagos humanos diferenciados en presencia del M-CSF humano en los ratones humanizados exhiben propiedades funcionales aumentadas.

Generar un ratón con un sistema hematopoyético/inmunológico completamente funcional y reconstituido de origen humano ha sido un gran desafío en el campo. Hasta la fecha, se han desarrollado 3 cepas de ratón (NOD-scid γc<sup>-/-</sup>, [NSG], NOD / Shi-scid γc<sup>-/-</sup> [NOG] y Balb/cRag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>). A pesar de las ventajas conferidas por cada una de estas cepas, la hematopoyesis humana es incompleta en estos ratones.

Para superar este desafío técnico principal, el gen CSF-1 de ratón se reemplazó por su equivalente humano. Esto dio como resultado una diferenciación eficaz de macrófagos humanos en ratones que se reconstituyeron con células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas. El análisis de los ratones humanizados con CSF-1 indicó una diferenciación eficaz de monocitos/macrófagos humanos en la MO, bazo y sangre periférica. Además, los macrófagos humanos se detectaron en varios tejidos diferentes, incluidos, pulmones e hígado, en estos ratones, lo que indica que la presencia del CSF-1 en ratones humanizados es suficiente para promover la diferenciación de los macrófagos del tejido humano. Adicionalmente, los estudios funcionales descritos en el presente documento que implican monocitos/macrófagos humanos, aislados de los ratones CSF1<sup>m/m</sup> y CSF1<sup>h/h</sup> indican que las células de los ratones CSF1<sup>h/h</sup> fueron mejores en la realización de funciones tales como fagocitosis, migración, activación y secreción de citoquinas. Basándose en estos hallazgos, se puede inferir que los monocitos/macrófagos que se diferencian en presencia del CSF-1 humano funcionan mejor.

La tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® se utilizó para generar una nueva línea de ratones Balb/c-Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> que expresan el CSF-1 humano. Por consiguiente, la región codificante del CSF-1 de ratón se reemplazó por la contraparte humana sin alterar los elementos reguladores, tales como el promotor, del gen *csf1* de ratón. Esto dio como resultado un gen quimérico que contenía los elementos reguladores del ratón y la región codificante del CSF-1 humano. Los estudios de expresión de estos ratones indicaron que este gen quimérico se expresa fielmente tanto de manera cualitativa como cuantitativa.

El papel del CSF-1 en la diferenciación de los macrófagos de ratón ha sido bien establecido. Los ratones que son deficientes para CSF-1 (*Csf1*<sup>op/op</sup>) o su receptor (*Csf1r*<sup>-/-</sup>) exhiben una reducción severa en las frecuencias de macrófagos y osteoclastos, osteopetrosis, fallo en la erupción dental, defectos de desarrollo en diversos tejidos, incluyendo el sistema nervioso, fertilidad masculina y femenina, la dermis y las membranas sinoviales. Si bien estos estudios han proporcionado ideas muy importantes sobre los roles del CSF-1 en ratones, la importancia del CSF-1 en la hematopoyesis humana sigue siendo en gran parte desconocida. A este respecto, los ratones descritos en el presente documento servirán como una herramienta valiosa, porque permitirán una mejor comprensión de la fisiología y las funciones de las citoquinas en la hematopoyesis humana y la función de las células hematopoyéticas. Adicionalmente, este ratón puede utilizarse para modelar enfermedades y evaluar los efectos de los agentes sobre el sistema inmune humano. Este modelo murino es una herramienta valiosa para comprender la fisiopatología y el tratamiento de varios trastornos y enfermedades en humanos.

Lo anterior simplemente ilustra los principios de la invención. Se apreciará que los expertos en la técnica podrán diseñar diversas disposiciones que, aunque no se describen explícitamente o se muestran en el presente documento, incorporan los principios de la invención y se incluyen dentro de su alcance. Además, todos los ejemplos y el lenguaje condicional citados en el presente documento pretenden principalmente servir de ayuda al lector en la comprensión de los principios de la invención y los conceptos aportados por los inventores para fomentar la técnica, y deben interpretarse sin limitación a tales ejemplos y condiciones específicamente citados. El alcance de la presente invención, por lo tanto, no pretende limitarse a las realizaciones a modo de ejemplo mostradas y descritas en el presente documento. Más bien, el alcance de la presente invención se incorpora en las reivindicaciones adjuntas.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Murphy, Andrew J.  
Stevens, Sean  
Rathinam, Chozhavendan  
Eynon, Elizabeth  
Manz, Markus  
Flavell, Richard

<120> Ratones humanizados con M-CSF

<130> REGN-002WO  
 <150> 61/442.946  
 <151> 2011-02-15  
 5 <160> 24  
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0  
 10 <210> 1  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 1  
 20 tactgtagcc acatgattgg ga 22  
 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 2  
 30 cctgtgtcag tcaaaggaac 20  
 <210> 3  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 40 <400> 3  
 cgacatggct gggctccc 18  
 <210> 4  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 50 <400> 4  
 cgcattgtct catctattat 20  
 <210> 5  
 <211> 27  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 60 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 5  
 gtactgcaga atctctcctt tctcctg 27  
 65 <210> 6  
 <211> 30

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 6  
 gtgtctagat ctgacaacct cccaggcaca 30  
  
 10 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 7  
 20 ttgtgcttct ccactacagc 20  
  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 8  
 30 ctgtaagtct gttaatgaag 20  
  
 <210> 9  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 9  
 40 aaggacctct cgaagtgtg gata 24  
  
 <210> 10  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 50  
  
 <400> 10  
 catttaaaag gaactgttga caacg 25  
  
 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 60  
  
 <400> 11  
 cttcctcctc ctgaggagtc 20  
  
 65 <210> 12  
 <211> 20

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 12  
 cctgaccaag gaaagcaaag 20  
  
 10 <210> 13  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 13  
 20 ccaggaatgt ccactatgga ttc 23  
  
 <210> 14  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 14  
 30 actgctcctt gaccctgctc tgactca 27  
  
 <210> 15  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
  
 40 <400> 15  
 tgggctgact tcccaaagg 19  
  
 <210> 16  
 <211> 25  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
  
 50 <400> 16  
 ttaggtgcta gtaggctgga aagtg 25  
  
 <210> 17  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 60 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 17  
 tgcaatcgca gcttctctcc ttactaggct 30  
  
 65 <210> 18  
 <211> 28

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 18  
 aataggaaga acgaacaggt ctaatacc 28  
  
 10 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 19  
 20 gctgcttgcc tgggtagtg 20  
  
 <210> 20  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 20  
 30 tgcccaggaa catcaaccac tgattctg 28  
  
 <210> 21  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 21  
 40 gagggacagc agacctcaga ag 22  
  
 <210> 22  
 <211> 19  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 50  
 <400> 22  
 ggtggagagg ctattcggc 19  
  
 <210> 23  
 55 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 23  
 tgggcacaac agacaatcgg ctg 23  
  
 65 <210> 24  
 <211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> oligonucleótido sintético

<400> 24

gaacacggcg gcatcag 17



**REIVINDICACIONES**

1. Un ratón humanizado con M-CSF, que comprende:

5 un bloqueo del gen *Rag2*;  
 un bloqueo del gen *IL2rg*; y  
 una secuencia de ácido nucleico incorporada en el genoma del ratón humanizado con M-CSF, secuencia que  
 codifica una proteína del factor estimulante de colonias de macrófagos humano (hM-CSF) y está unida  
 operativamente al promotor endógeno del gen del M-CSF de ratón en el locus M-CSF de ratón, en donde el ratón  
 10 expresa ARN del M-CSF codificado por la secuencia de ácido nucleico en médula ósea, bazo, sangre, hígado,  
 cerebro, pulmón, testículos y riñones.

2. El ratón humanizado con M-CSF de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ratón comprende dos copias de  
 la secuencia de ácido nucleico.

15 3. El ratón humanizado con M-CSF de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ratón comprende una mutación  
 nula en al menos un alelo del M-CSF de ratón.

4. El ratón humanizado con M-CSF de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ratón es homocigoto nulo para  
 20 *Rag2* e *IL2rg* y en donde el ratón comprende células humanas.

5. El ratón humanizado con M-CSF de acuerdo con la reivindicación 4, en donde las células humanas son células  
 hematopoyéticas.

25 6. El ratón humanizado con M-CSF de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el ratón se infecta mediante un  
 patógeno humano.

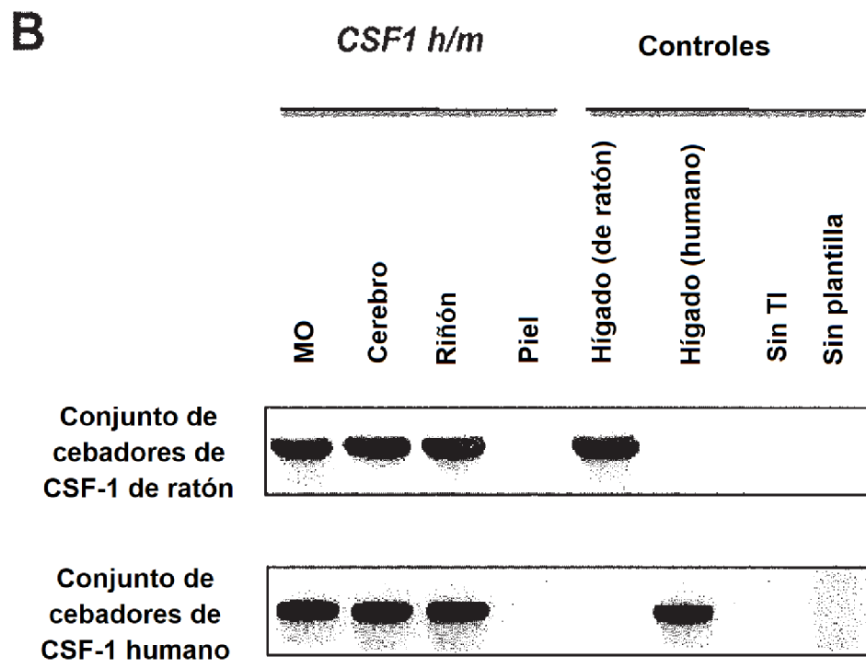
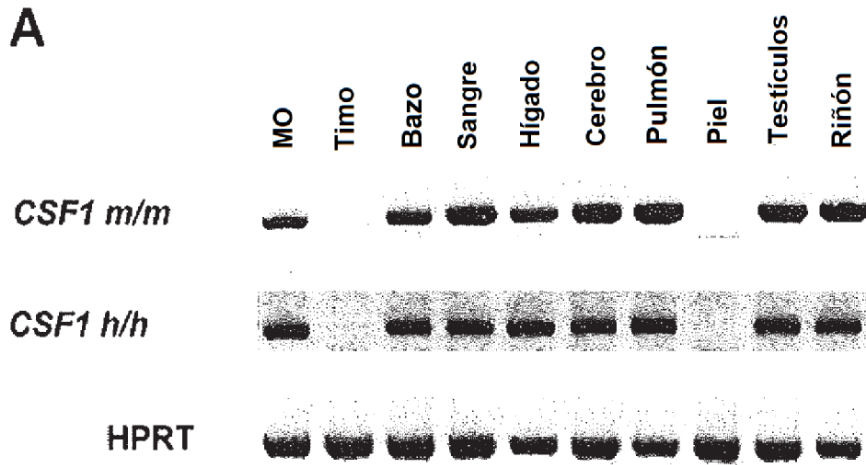
7. Uso del ratón humanizado con M-CSF de acuerdo con la reivindicación 5 como modelo murino del sistema  
 hematopoyético humano.

30 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el ratón comprende una delección nula para el M-CSF de  
 ratón.

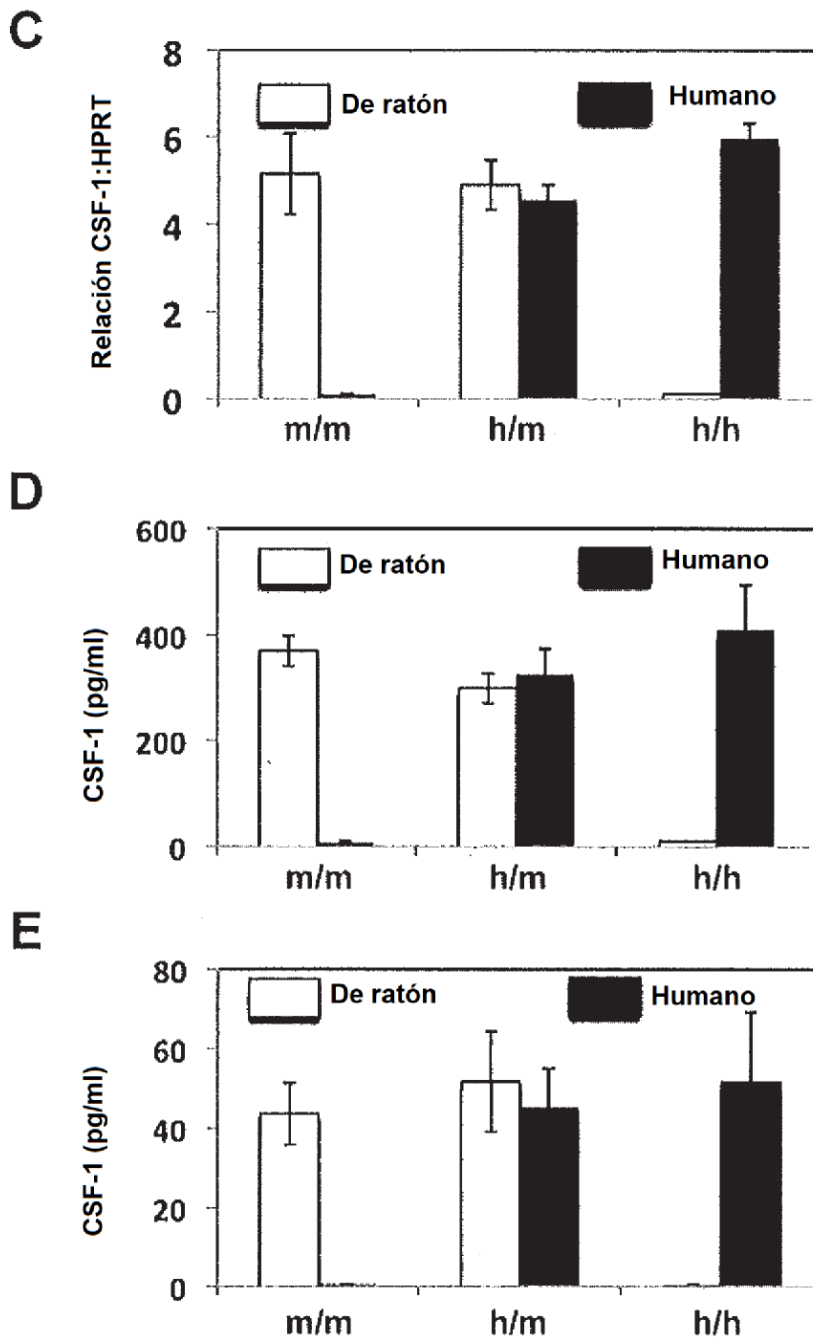
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el ratón exhibe una o más características seleccionadas de:

- 35 a. expresa el M-CSF humano en médula ósea, bazo, sangre, hígado, cerebro, pulmón, testículos y riñones a un  
 nivel comparable a la expresión del M-CSF de ratón en un ratón de tipo silvestre;  
 b. exhibe una frecuencia de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> del bazo que es de 2 a 6 veces mayor que hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en  
 un ratón injertado que no expresa el hM-CSF;  
 40 c. exhibe una frecuencia en células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> de la sangre periférica que es de 2 a 8 veces mayor que  
 hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en un ratón injertado que no expresa el hM-CSF;  
 d. exhibe un nivel de células del linaje monocito/macrófago hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en sangre de aproximadamente el 15  
 a aproximadamente el 40 %;  
 45 e. exhibe un nivel de células de linaje monocito/macrófago hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en sangre de aproximadamente el 5 a  
 aproximadamente el 15 % a las aproximadamente 20 semanas de edad;  
 f. exhibe una respuesta a la inyección de LPS que es aproximadamente 1,5 a aproximadamente 6 veces mayor  
 con respecto al porcentaje de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> en el hígado que en los ratones que carecen del M-CSF  
 humano;  
 50 g. exhibe una producción mejorada de células hCD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>hCD45<sup>+</sup> en el bazo aproximadamente 48 horas  
 después de la inyección de LPS, en donde la mejora es aproximadamente de 2 a aproximadamente 5 veces  
 frente a un ratón injertado que carece del hM-CSF;  
 h. exhibe una producción mejorada de IL-6 humana en suero en respuesta a LPS, en donde el nivel de hIL-6  
 aproximadamente 6 horas después de la inyección de LPS mejora aproximadamente de 2 a aproximadamente 5  
 veces frente a un ratón injertado que carece de hM-CSF;  
 55 i. exhibe secreción *in vitro* por un monocito y/o un macrófago tras la estimulación con LPS que es  
 aproximadamente de 2 a 3 veces mayor con respecto al hTNF $\alpha$  que en un ratón injertado que carece de un gen  
 del hM-CSF;  
 j. exhibe secreción *in vitro* por un monocito y/o un macrófago tras la estimulación con LPS que es  
 aproximadamente de 2 a 4 veces mayor con respecto al hIL-6 que en un ratón injertado que carece de un gen  
 60 del hM-CSF;  
 k. exhibe secreción *in vitro* por un monocito y/o un macrófago tras la estimulación con poli I:C que es  
 aproximadamente de 3 a 6 veces mayor con respecto al hINF $\alpha$  que en un ratón injertado que carece de un gen  
 del hM-CSF;  
 65 l. exhibe secreción *in vitro* por un monocito y/o un macrófago tras la estimulación con poli I:C que es  
 aproximadamente de 2 a 3 veces mayor con respecto al hINF $\beta$  que en un ratón injertado que carece de un gen  
 del hM-CSF;

- m. exhibe fagocitosis mejorada en comparación con un ratón genéticamente modificado e injertado que carece de un gen del hM-CSF;
  - n. exhibe quimiotaxis *in vitro* mejorada en respuesta a Mip3 $\beta$  en comparación con un ratón genéticamente modificado injertado que carece de un gen del hM-CSF; y
  - 5 o. exhibe regulación positiva *in vitro* de una molécula coestimuladora en respuesta a la estimulación con LPS, en donde la molécula coestimuladora se selecciona de CD40 humano, CD80 humano, CD86 humano, HLA-DR humano y una combinación de las mismas.
10. Uso del ratón humanizado con M-CSF de acuerdo con la reivindicación 6 como modelo murino de una infección patógena humana.
- 10
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el patógeno se selecciona de un virus, un hongo y una bacteria.
- 15 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la bacteria es una micobacteria o una enterobacteria.



FIGURAS 1A Y 1B



FIGURAS 1C, 1D Y 1E

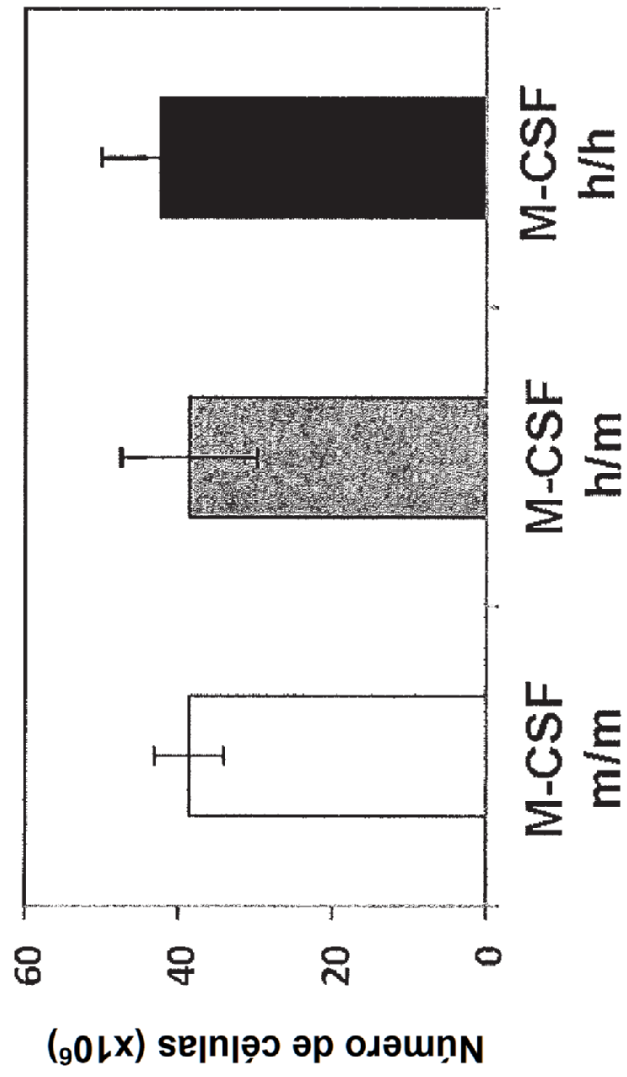


FIG. 2A

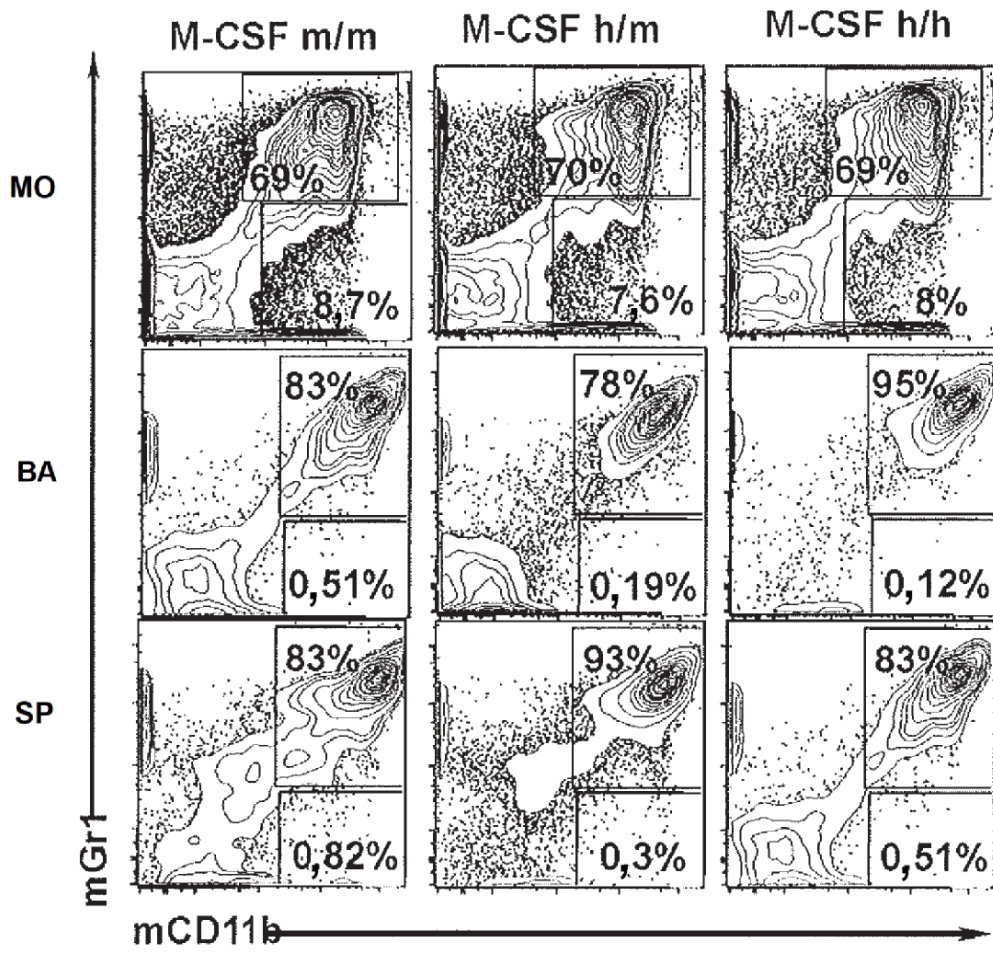


FIG. 2B

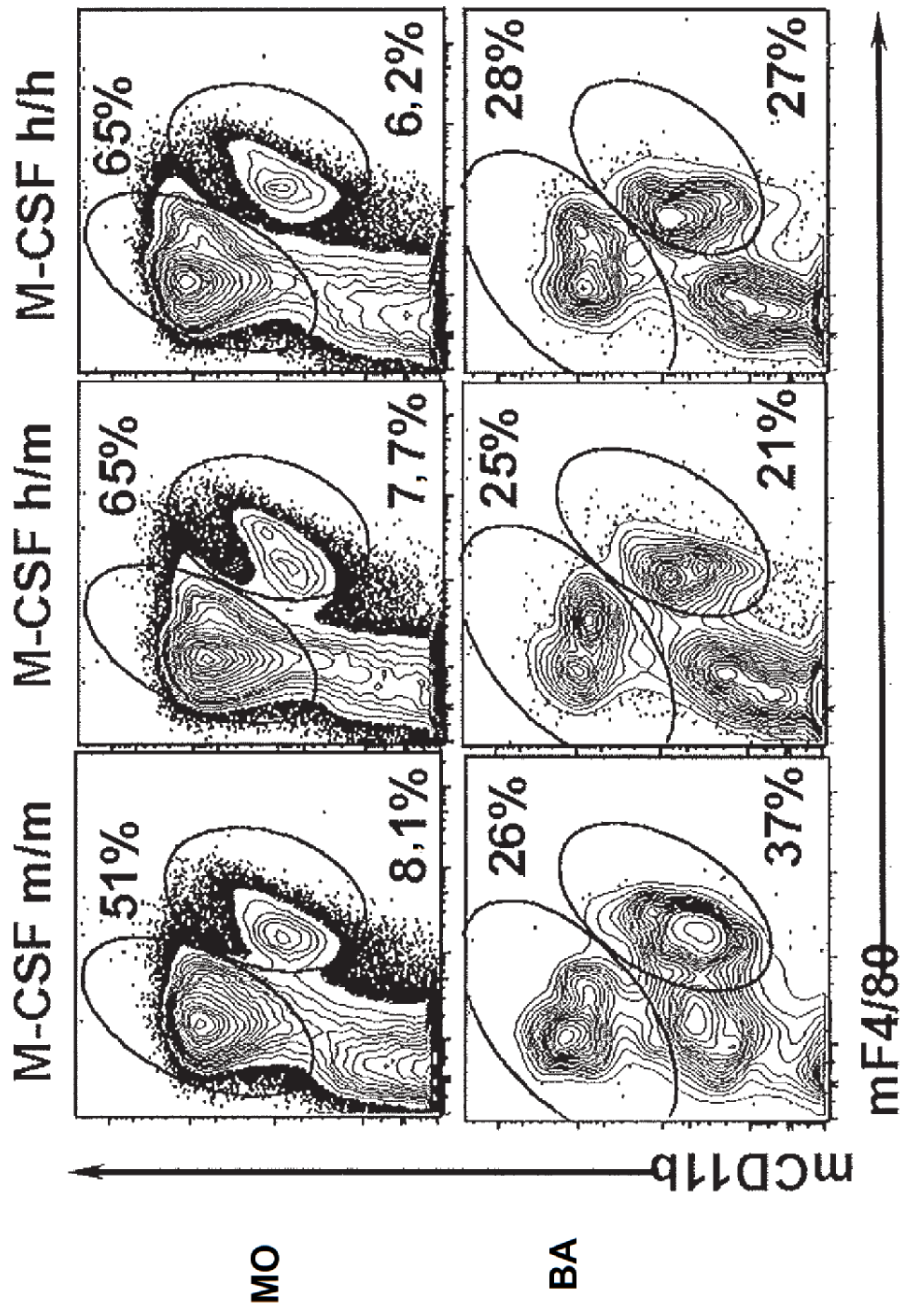


FIG. 2C

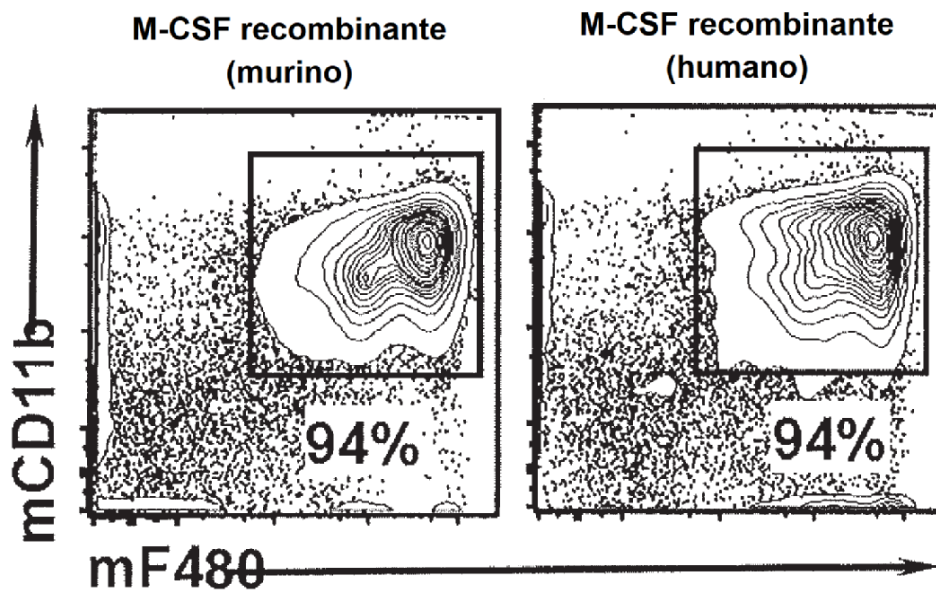


FIG. 2D



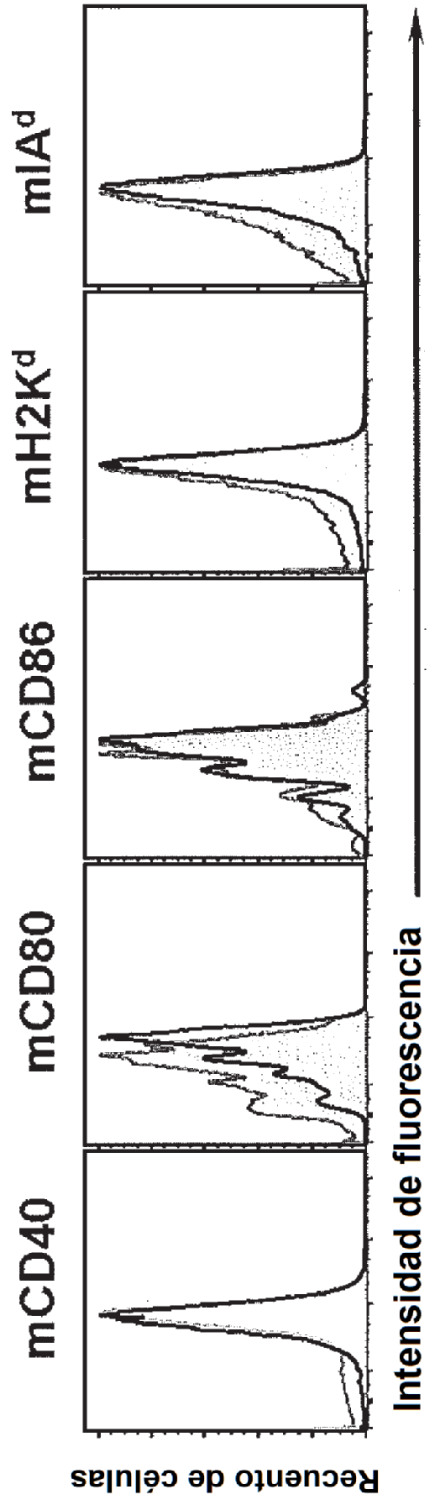


FIG. 2E

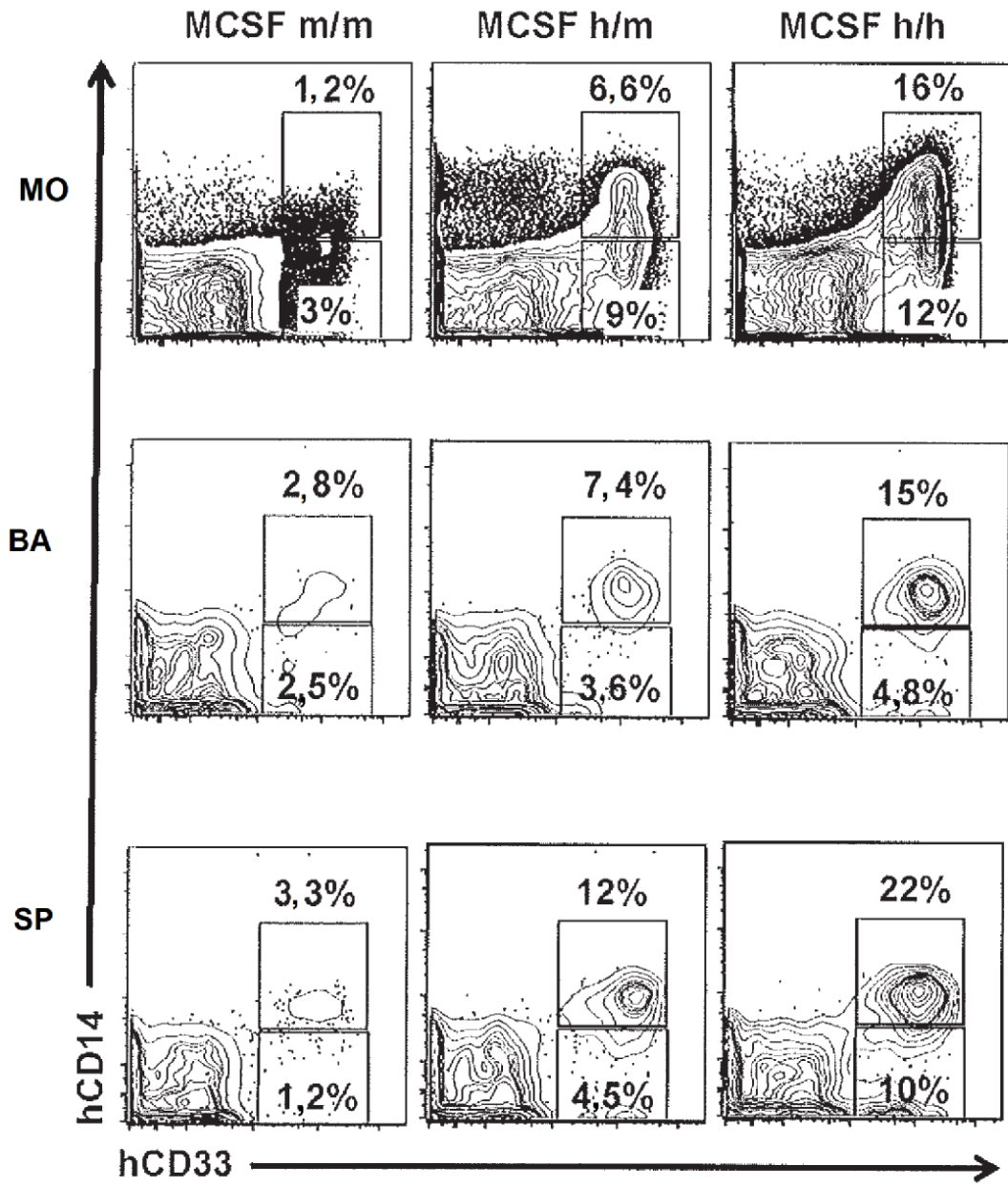


FIG. 3A

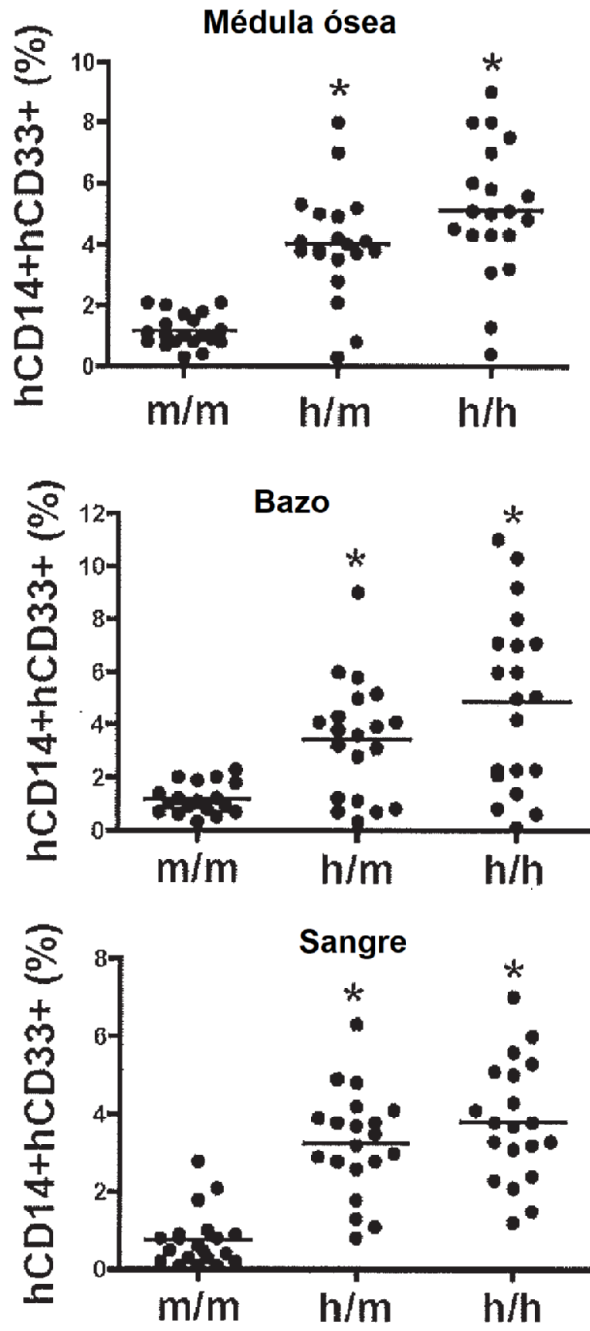


FIG. 3B

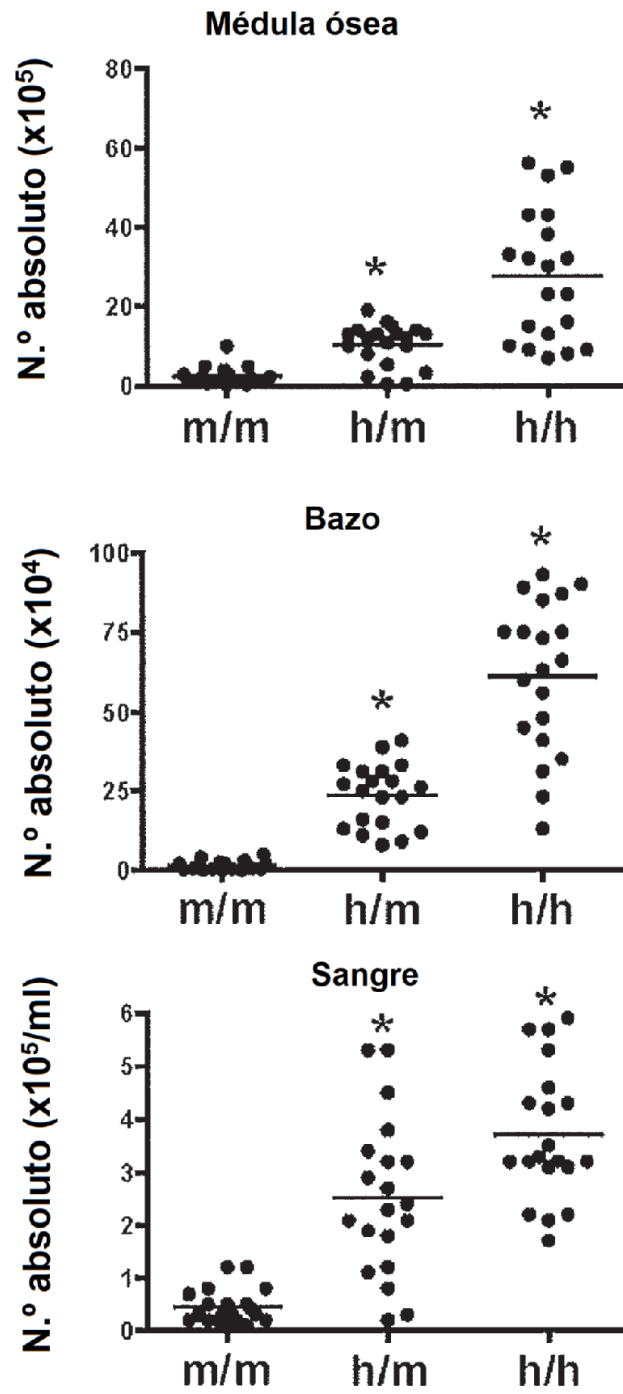


FIG. 3C

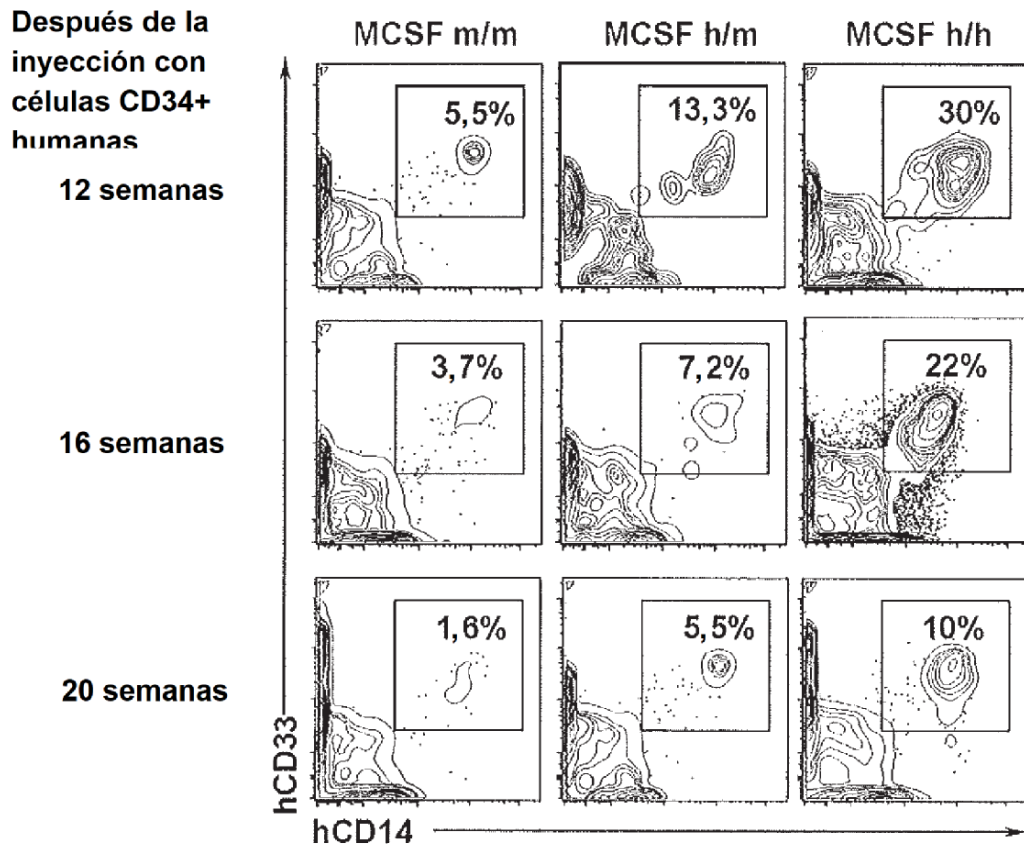


FIG. 4A

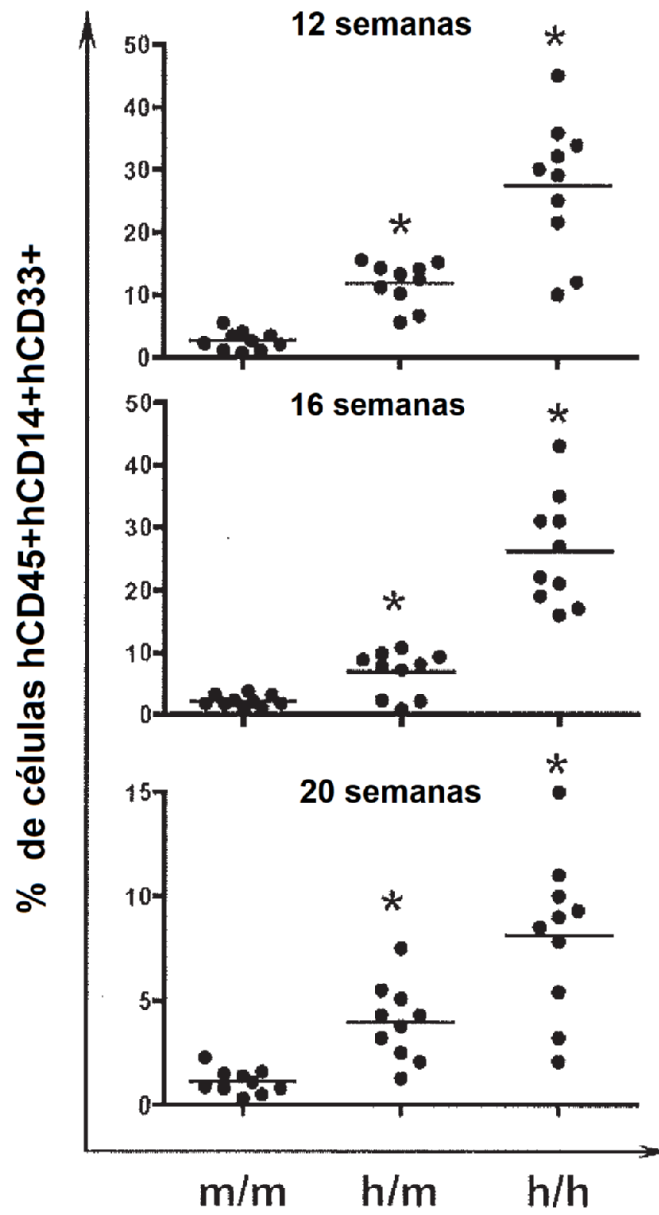


FIG. 4B

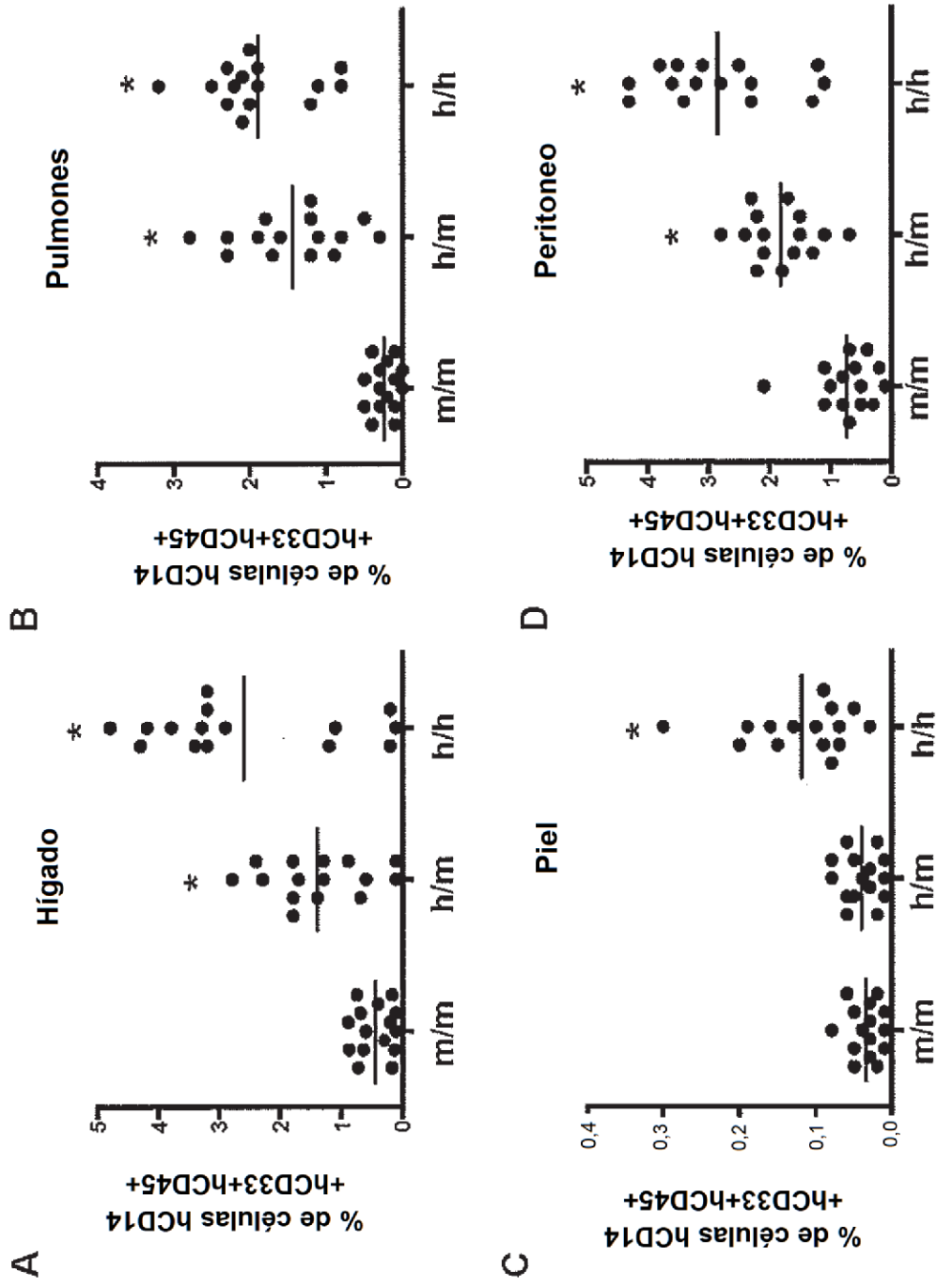
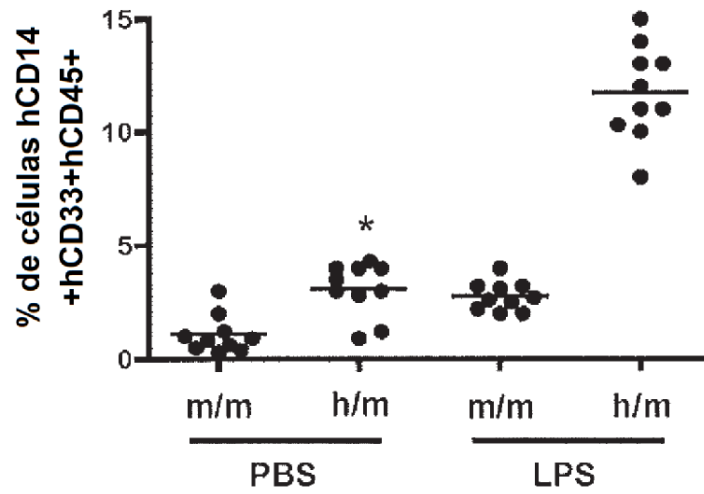


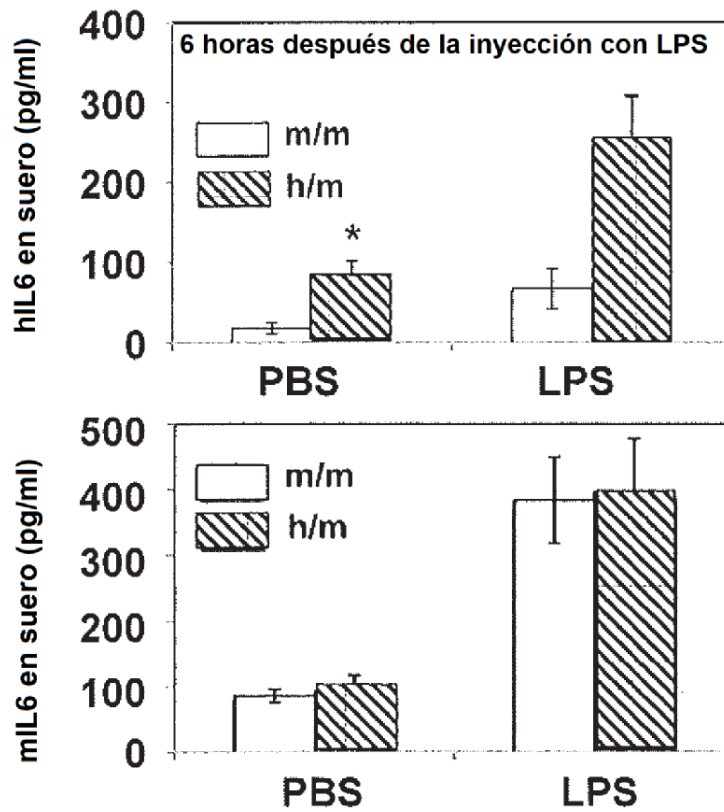
FIG. 5

**A**

48 horas después de la inyección con LPS



**B**



FIGURAS 6A Y 6B



C

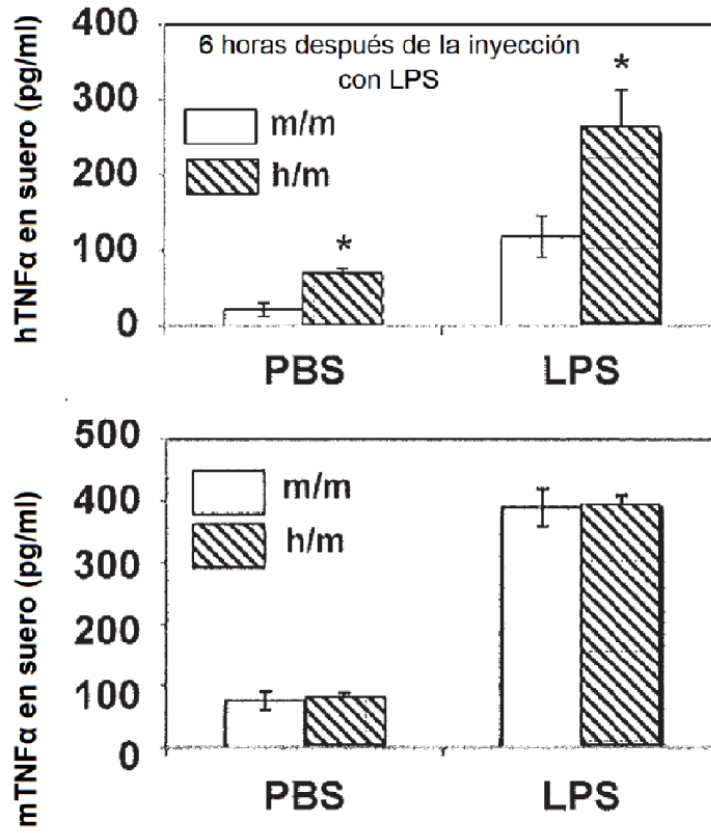


FIG. 6C

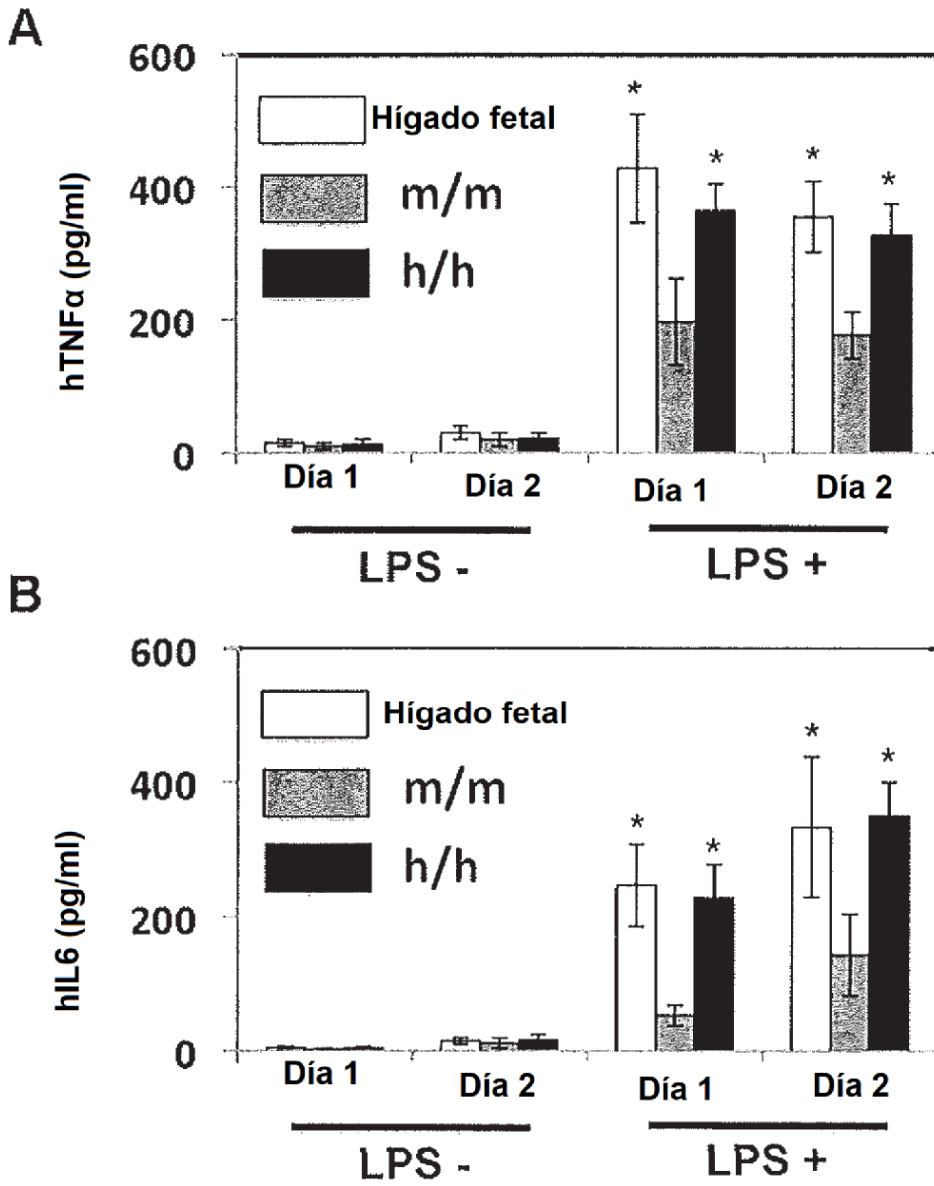


FIG. 7A,B

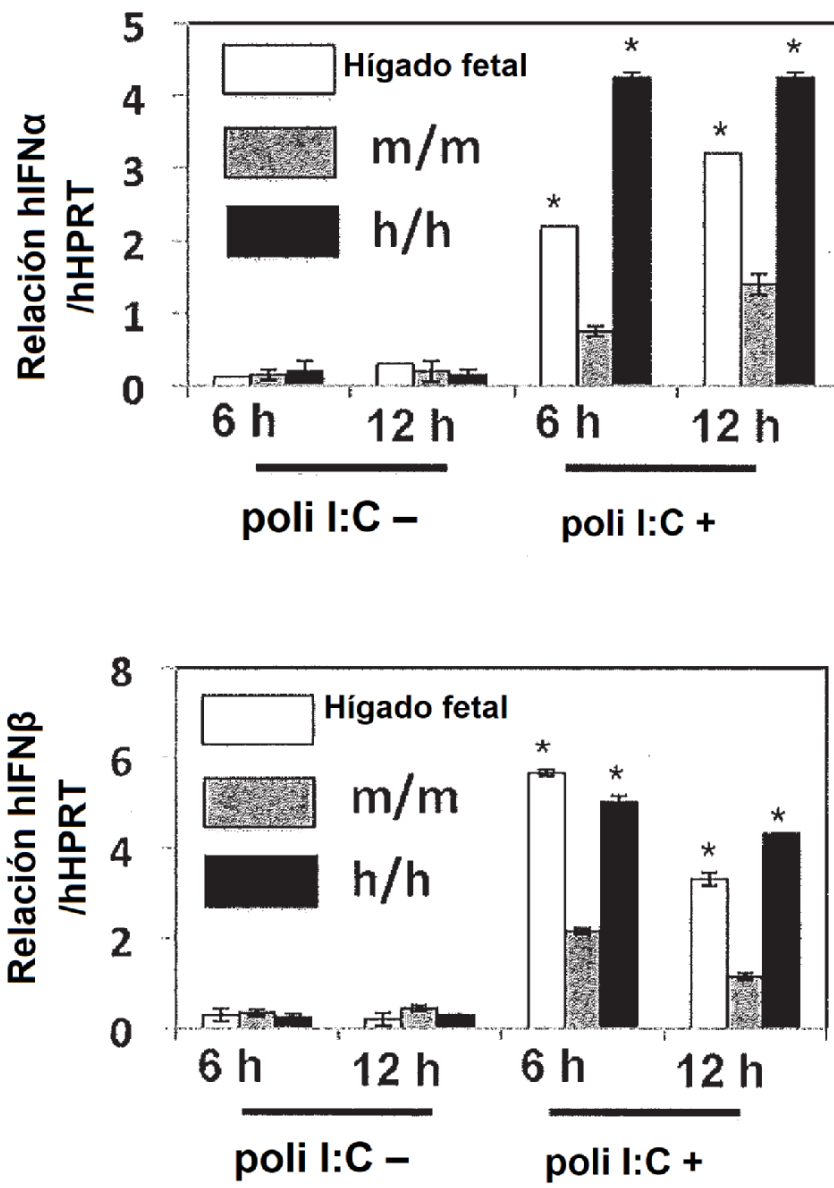


FIG. 7C

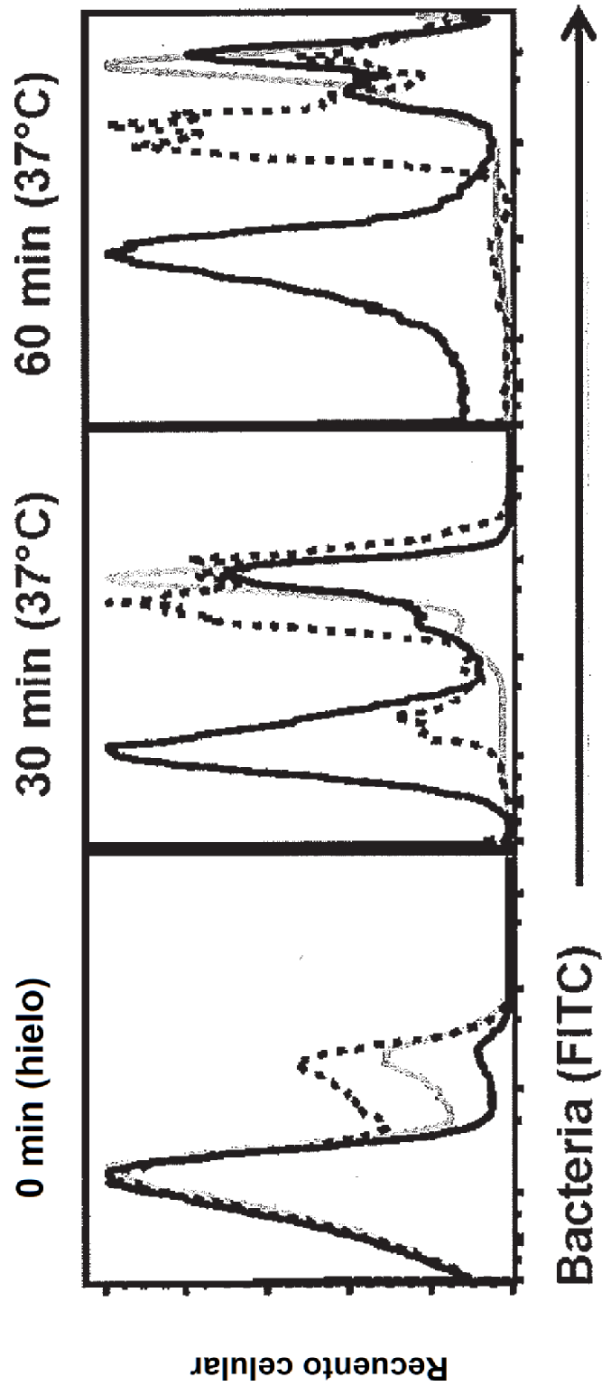


FIG. 7D

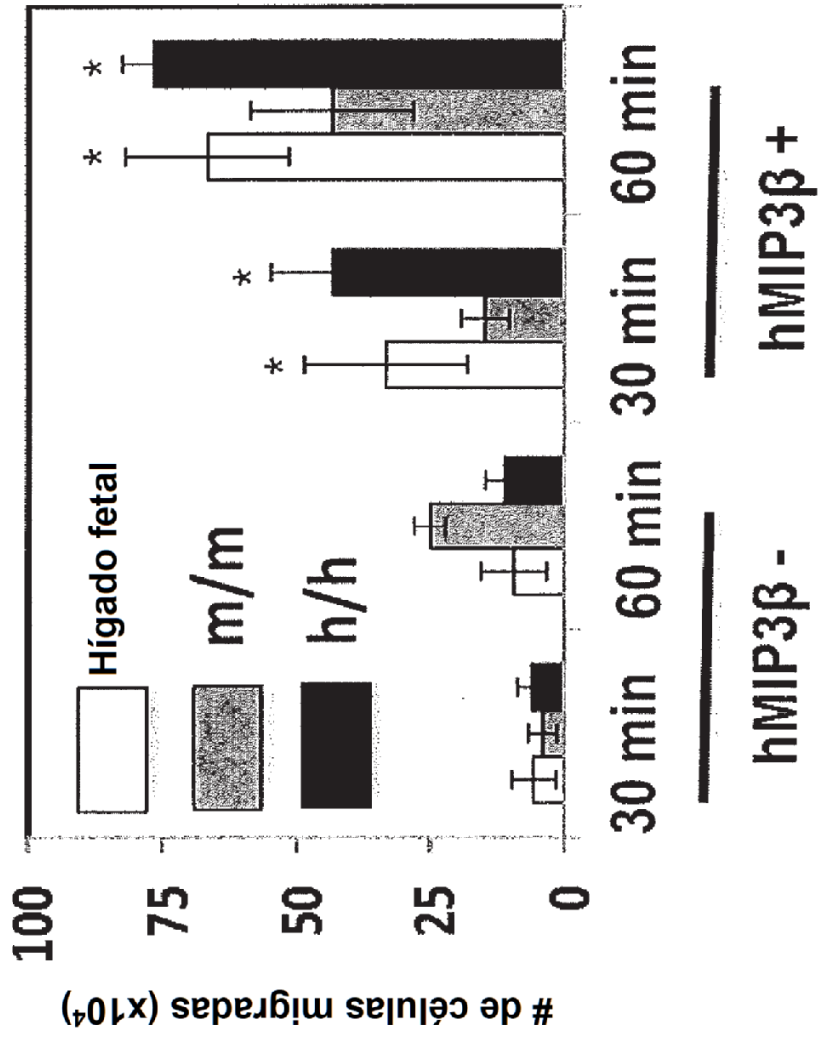


FIG. 7E

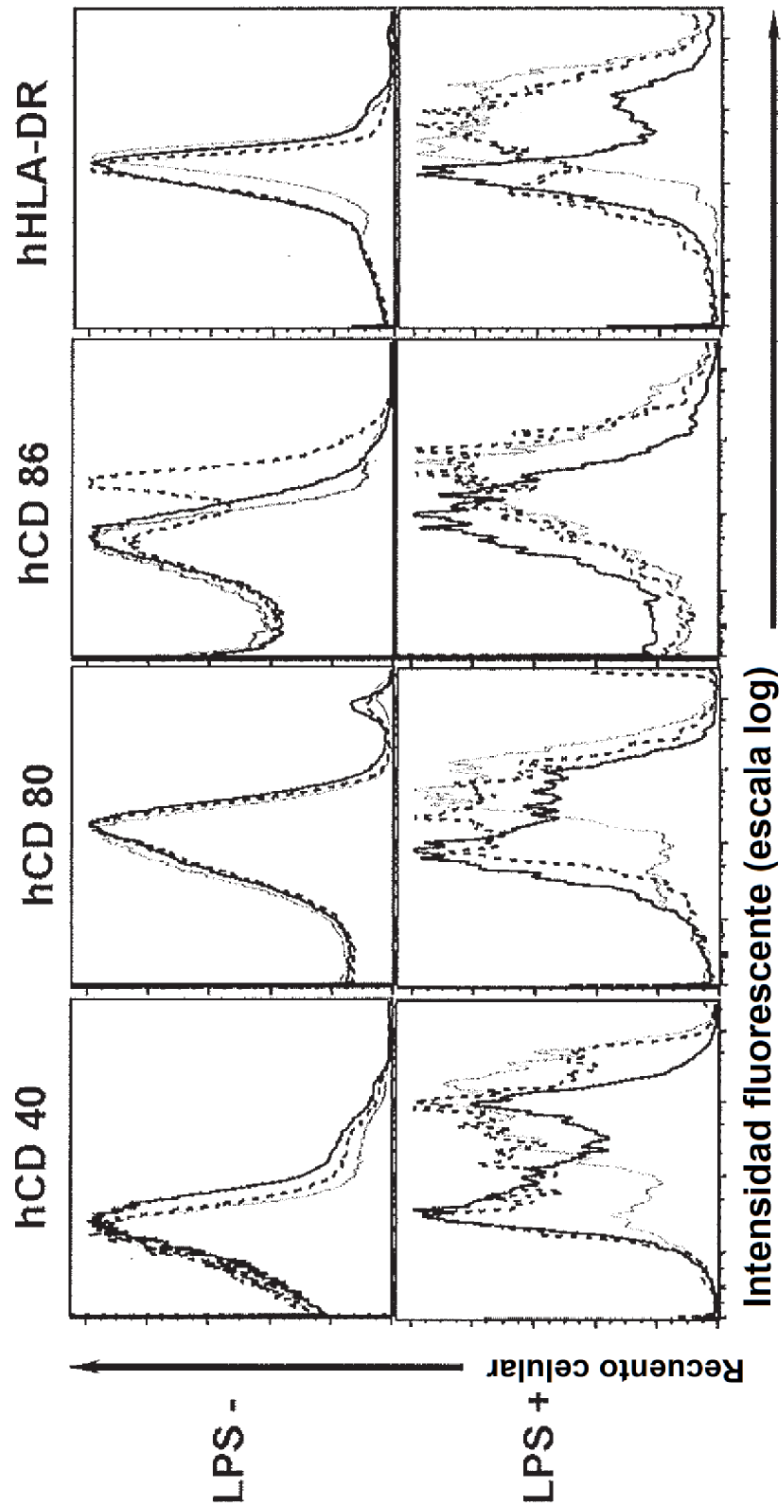


FIG. 7F

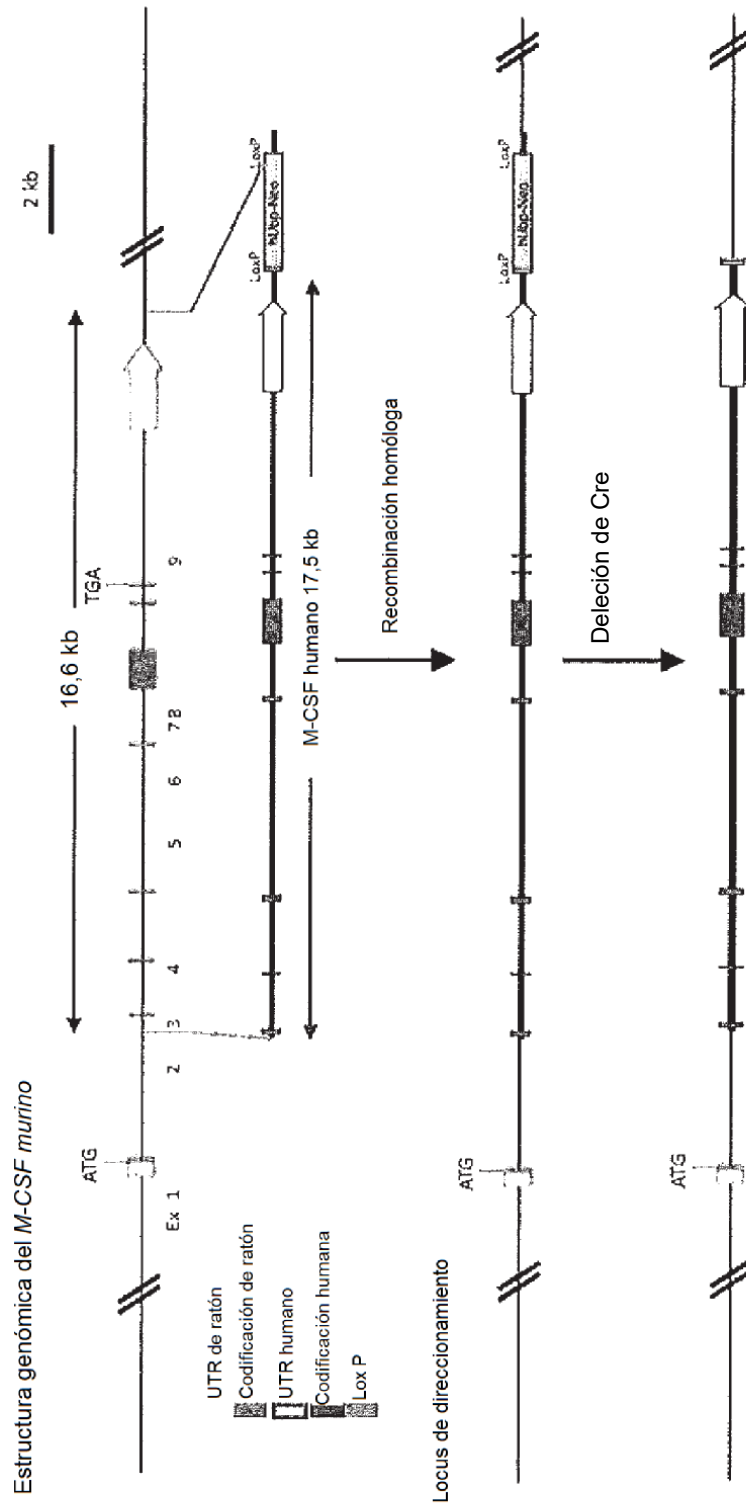


FIG. 8

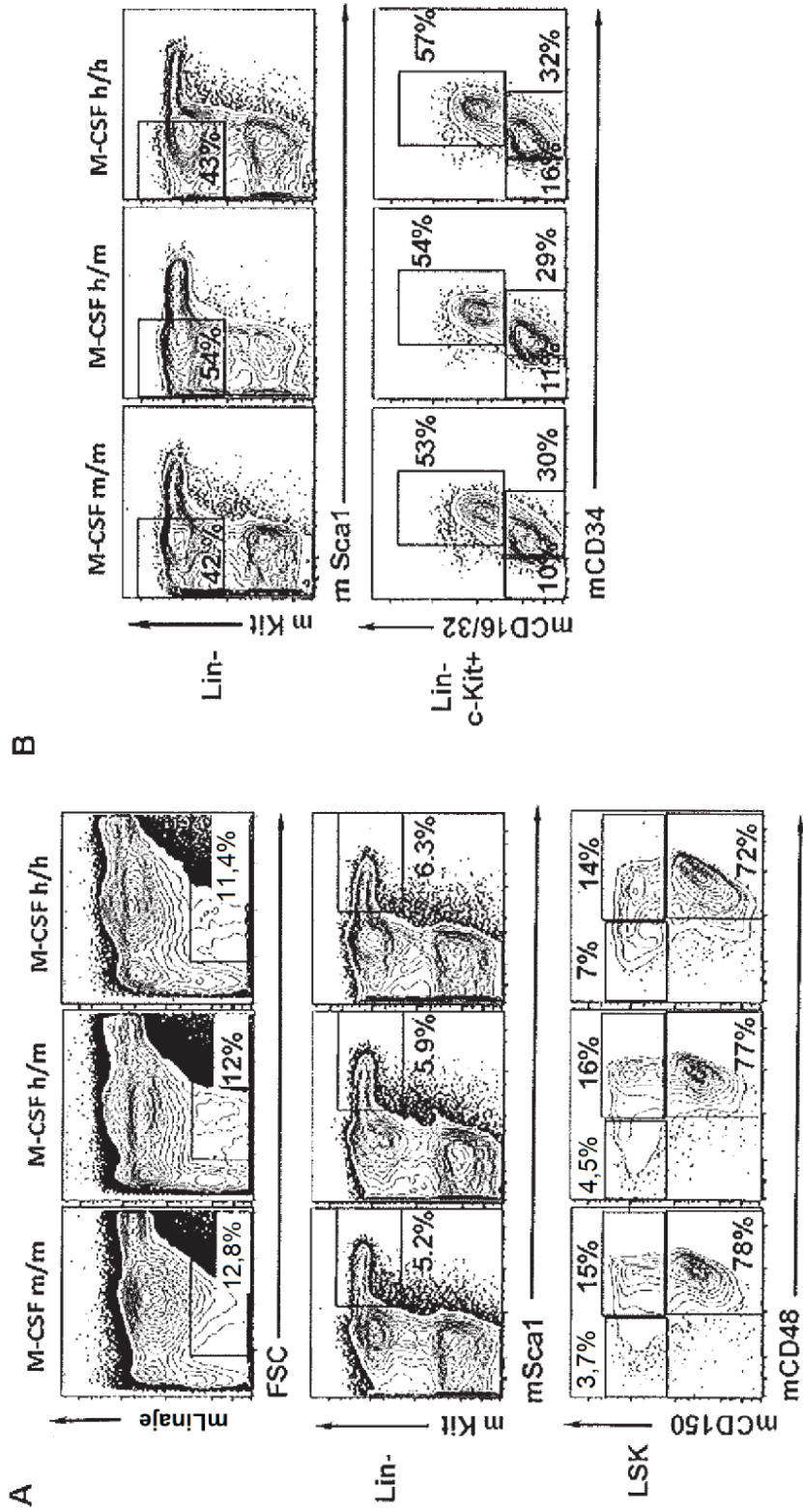


FIG. 9