

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 852**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 14/535 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2010 E 16157878 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 3056082**

54 Título: **Ratones modificados genéticamente e injerto**

30 Prioridad:

06.10.2009 US 249069 P
29.10.2009 US 256237 P
01.04.2010 US 320132 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2019

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:

STEVENS, SEAN;
MURPHY, ANDREW J.;
FLAVELL, RICHARD;
EYNON, ELIZABETH;
GALAN, JORGE;
WILLINGER, TIM;
MANZ, MARKUS, G.;
RONGVAUX, ANTHONY y
YANCOPOULOS, GEORGE D.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 700 852 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 modificados genéticamente e injerto

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere al campo de los animales no humanos modificados genéticamente, en particular ratones inmunocomprometidos que tienen un gen RAG inactivado, un gen Il2rgll2rg inactivado y una humanización de un gen TPO; injertados con células hematopoyéticas humanas; e infectados con un patógeno humano, por ejemplo, *Salmonella typhi* o *Mycobacterium tuberculosis*.

Antecedentes

Los ratones modificados genéticamente, ratones modificados e injertados y su uso en la generación de modelos de enfermedades humanas, por ejemplo, con el fin de probar fármacos, se conocen en la técnica. Se han realizado intentos de usar ratones modificados genéticamente para realizar un modelo del sistema inmunitario humano. Una revisión de este campo se proporciona en Manz (2007) Human-Hemato-Lymphoid-System Mice: Opportunities and Challenges, *Immunity*, 26:537-541.

Hasta la fecha, no se han generado ratones modificados genéticamente que demuestren infectividad con ciertos patógenos humanos, por ejemplo, *Salmonella typhi* (*S. typhi*). Incluso para las infecciones por patógenos para los que existen modelos en ratones, los modelos pueden fallar en cuanto a modelizar adecuadamente determinadas patologías en seres humanos, por ejemplo, fracasan en la formación de granulomas bien definidos o granulomas que contienen las células inmunitarias humanas en modelos en ratón de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. Tuberculosis*). Con el fin de estudiar los efectos de ciertos patógenos sobre los seres humanos y para probar la eficacia de fármacos en el tratamiento de seres humanos infectados con ciertos patógenos, sería útil disponer de un animal no humano, tal como un ratón, que se haya modificado genéticamente de manera que sea susceptible a la infección con dicho patógeno, por ejemplo, *S. typhi*, y/o que la infección se asemeje más estrechamente a la patología humana, por ejemplo, modelos más estrechamente relacionados con una infección humana de *M. tuberculosis*.

En general, existe la necesidad de ratones modificados genéticamente que puedan apoyar el mantenimiento y la propagación de células madre hematopoyéticas humanas, y de ratones adecuados para el injerto que puedan modelizar o aproximarse a ciertos aspectos de un sistema hemato-linfoide humano, por ejemplo, en respuesta a un patógeno humano.

Sumario

Se proporcionan ratones modificados genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1. los ratones comprenden genes endógenos inactivados y uno o más genes humanizados (es decir, la sustitución de un gen endógeno en su locus endógeno por un ortólogo u homólogo humano).

Se proporcionan ratones modificados genéticamente que comprenden células hematopoyéticas humanas.

Se proporcionan ratones modificados genéticamente e injertados, que están infectados con un patógeno humano que no infecte a los ratones de tipo silvestre. Se proporcionan ratones que, en respuesta a una exposición a un patógeno humano (por ejemplo, *M. tuberculosis*) producen una respuesta inmunitaria que tiene características (por ejemplo, formación de granulomas bien definidos o granulomas que comprenden células inmunitarias humanas) que no se observan en los ratones de tipo silvestre.

En el presente documento se desvelan ratones modificados genéticamente, irradiados e injertados para la identificación de cepas de patógenos humanos resistentes a fármacos, para probar vacunas humanas y para desarrollar y analizar fármacos antipatógenos, así como composiciones y métodos para su uso.

Se desvelan ratones modificados genéticamente capaces de recibir y propagar células inmunitarias humanas, incluyendo ratones que puedan soportar una neoplasia hematopoyética humana.

En un aspecto, se proporciona un ratón modificado genéticamente, de acuerdo con la reivindicación 4.

La inactivación del gen RAG es una inactivación del gen RAG2.

la humanización comprende la sustitución de un gen mTPO por un gen hTPO. En una realización específica, la humanización consiste esencialmente en la humanización de un gen mTPO con un gen hTPO.

En una realización, la humanización comprende la sustitución de un gen mL-3 por un gen de IL-3 humana (hIL-3) y la sustitución de un gen mGM-CSF por un gen de GM-CSF humano (hGM-CSF). El ratón comprende la sustitución de un gen mTPO por un gen TPO humano (hTPO).

En una realización, la humanización comprende una sustitución de un gen mGM-CSF por un gen GM-CSF humano, y en el ratón, el GM-CSF humano no se expresa predominantemente en el hígado y la circulación. En una realización, el GM-CSF humano se expresa predominantemente en el pulmón de ratón. En una realización, La expresión de GM-CSF humano es específica de tejido y refleja la expresión específica de tejido en un ser humano.

5 En una realización, el ratón modificado genéticamente se trata a fin de eliminar las células hematopoyéticas endógenas que pueden existir en el ratón. En una realización, el tratamiento comprende irradiar el ratón modificado genéticamente. En una realización específica, ratones neonatos modificados genéticamente se irradian de forma subletal. En una realización específica, las crías recién nacidas se irradian 2 x 200 cGy con un intervalo de cuatro horas.

10 En una realización, En el ratón modificado genéticamente y tratado se injertan células hematopoyéticas humanas para formar un ratón modificado genéticamente e injertado. En una realización, las células hematopoyéticas se seleccionan a partir de células sanguíneas de cordón umbilical humano y células hepáticas fetales humanas. En una realización, el injerto se realiza con aproximadamente $1-2 \times 10^5$ células CD34 + humanas.

15 En una realización, el ratón modificado genéticamente e injertado da lugar a una célula humana seleccionada de una célula CD34+, una célula madre hematopoyética, una célula hematopoyética, una célula precursora mieloide, una célula mieloide, una célula dendrítica, un monocito, un granulocito, un neutrófilo, un mastocito, un timocito, un linfocitos T, un linfocito B, una plaqueta, y una combinación de las mismas. En una realización, la célula humana está presente a los 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 12 meses después del injerto.

20 En una realización, el ratón modificado genéticamente e injertado da lugar a un sistema hemato-linfoide humano que comprende células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas, células progenitoras mieloides humanas, células mieloides humanas, células dendríticas humanas, monocitos humanos, granulocitos humanos, neutrófilos humanos, mastocitos humanos, timocitos humanos, linfocitos T humanos, linfocitos B humanos y plaquetas humanas. En una realización, el sistema hemato-linfoide humano está presente a los 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 12 meses después del injerto.

25 En una realización, el ratón modificado genéticamente e injertado exhibe una respuesta inflamatoria mediada por una célula humana. En una realización específica, la célula humana es un macrófago. En una realización específica, la respuesta inflamatoria mediada por macrófagos está mediada por un macrófago alveolar. En una realización específica, la respuesta mediada por el macrófago alveolar comprende la formación de un granuloma. En una realización específica, el granuloma comprende una célula inmunitaria humana. En una realización específica, el granuloma es un granuloma bien organizado. En una realización específica, el granuloma se forma tras la exposición a una micobacteria, por ejemplo, *M. tuberculosis*. En una realización, el ratón exhibe una respuesta inflamatoria que comprende dos o más granulomas. En una realización, el ratón modificado genéticamente e injertado es un modelo para infección humana por *M. tuberculosis*.

30 En una realización, el ratón modificado genéticamente e injertado exhibe una respuesta inflamatoria mediada por una célula humana. En una realización específica, la célula humana es un macrófago. En una realización específica, la respuesta inflamatoria mediada por macrófagos está mediada por un macrófago alveolar. En una realización específica, la respuesta mediada por el macrófago alveolar comprende la formación de un granuloma. En una realización específica, el granuloma comprende una célula inmunitaria humana. En una realización específica, el granuloma es un granuloma bien organizado. En una realización específica, el granuloma se forma tras la exposición a una micobacteria, por ejemplo, *M. tuberculosis*. En una realización, el ratón exhibe una respuesta inflamatoria que comprende dos o más granulomas. En una realización, el ratón modificado genéticamente e injertado es un modelo para infección humana por *M. tuberculosis*.

35 En una realización, el ratón modificado genéticamente e injertado comprende una infección por *M. tuberculosis* caracterizada, al menos en parte, por la formación de un granuloma que comprende una célula inmunitaria humana. En una realización específica, el granuloma es un granuloma bien organizado. En una realización específica, *M. tuberculosis* es una cepa resistente a un fármaco o resistente a múltiples fármacos de *M. tuberculosis* que infecta a una población humana. En una realización, el ratón infectado con *M. tuberculosis* comprende un granuloma en un pulmón. En una realización específica, el granuloma es un granuloma bien desarrollado. En una realización específica, el granuloma en el pulmón comprende células inmunitarias humanas. En una realización específica, las células inmunitarias humanas del granuloma se seleccionan a partir de un macrófago activado humano, un linfocito T humano activado y una combinación de los mismos.

40 En una realización, el ratón modificado genéticamente e injertado exhibe inmunidad de la mucosa mejorada en comparación con un ratón injertado que carece de una humanización de una o más de los genes IL-3, GM-CSF y TPO. En una realización específica, la inmunidad de la mucosa mejorada comprende una expresión mejorada de interferón β (IFN β) después de la infección por gripe A.

45 En una realización, el ratón modificado genéticamente e injertado comprende una infección seleccionada de una infección por *M. tuberculosis* y por *S. typhi*. En una realización, el ratón reproduce *S. typhi* o *M. tuberculosis*. En una realización, el ratón produce una respuesta inmunitaria anti-micobacteriana frente a una micobacteria patógena humana, en la que la respuesta comprende la formación de un granuloma mediado por las células inmunitarias humanas y que comprende una célula inmunitaria humana. En una realización específica, el granuloma es un granuloma bien desarrollado.

50 el ratón modificado genéticamente e injertado comprende una humanización que comprende la humanización de un gen mTPO para formar un ratón con injerto de hTPO. En una realización, el ratón con injerto de hTPO exhibe un aumento de las células mieloides humanas en la médula ósea respecto a un ratón injertado que comprende un gen mTPO pero ningún gen hTPO. En una realización específica, las células mieloides humanas aumentan 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces o 3 veces respecto a un ratón injertado que carece de un gen hTPO. En una realización específica, el aumento de los granulocitos es de aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces o 3 veces. En otra realización,

- 5 se observa un aumento de los monocitos de sangre periférica respecto a un ratón injertado que carece de un gen hTPO, en el que el aumento en los monocitos de sangre periférica es de aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces o 3 veces. En una realización, el ratón injertado modificado genéticamente comprende una humanización que consiste esencialmente en un gen hTPO que reemplaza a un gen mTPO, en el que el ratón no expresa un TPO de ratón, sino que expresa un TPO humano.
- 10 En un aspecto, se proporciona un ratón modificado genéticamente e injertado de acuerdo con la reivindicación 1 y comprende una neoplasia maligna hematopoyética humana que se origina a partir de una célula hematopoyética humana temprana. En una realización específica, la neoplasia maligna se selecciona de una leucemia mieloide y una neoplasia mieloproliferativa.
- 15 En una realización, el ratón comprende además un gen de IL-3 humana y un gen de GM-CSF humano, y una inactivación de un gen endógeno de IL-3 de ratón y una inactivación de un gen de GM-CSF endógeno de ratón.
- 20 En el presente documento se desvela un ratón que comprende una inactivación del gen RAG, una inactivación del gen Il2rg, y una modificación genética que proporciona células mieloides humanas con una ventaja competitiva con respecto a las células mieloides de ratón. En una realización, la modificación genética es una sustitución de un gen de ratón requerido para el desarrollo de células mieloides de ratón y/o el mantenimiento con un gen humano equivalente. En una realización, la modificación genética se selecciona entre una sustitución de un gen de IL-3 de ratón con un gen de IL-3 humana, una sustitución de un gen de GM-CSF de ratón con un gen de GM-CSF humano, y una combinación de las mismas. En una realización, el ratón carece de o carece sustancialmente de células hematopoyéticas endógenas de ratón y comprende células hematopoyéticas humanas.
- 25 En un aspecto, se proporciona un método para fabricar un ratón que se infecta con un patógeno humano, de acuerdo con la reivindicación 5. En una realización, el patógeno humano se selecciona de *M. tuberculosis* y *S. typhi*. En una realización, el patógeno humano es un patógeno humano que no es patógeno en un ratón que carece de la una o más modificaciones genéticas. En una realización, el patógeno humano es un patógeno humano que no infecta a un ratón que carece de la una o más modificaciones genéticas.
- 30 En el presente documento se desvela un método para determinar el efecto de un fármaco sobre un patógeno humano, que comprende exponer un ratón modificado genéticamente e injertado como se describe en el presente documento a un patógeno humano, permitir que el agente patógeno infecte al ratón, y medir un parámetro de la infección con el tiempo en presencia y en ausencia del fármaco. En una realización, el patógeno humano es un patógeno que no infecta a un ratón que carece de la una o más modificaciones genéticas. En una realización, el patógeno humano se selecciona de *M. tuberculosis* y *S. typhi*. En una realización, 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.
- 35 En una realización, el parámetro de la infección es un título en un fluido corporal del ratón. En una realización, la infección se selecciona de una infección por *M. tuberculosis* y una infección por *S. typhi*. En una realización específica, la infección es una infección por *M. tuberculosis* y el parámetro es la formación de un granuloma. En una realización específica, el granuloma es un granuloma de pulmón. En otra realización específica, el granuloma es un granuloma bien definido.
- 40 En un aspecto, se proporciona un ratón modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 4; en el que el ratón, tras la irradiación para anular las células hematopoyéticas endógenas de ratón y tras el injerto células madre hematopoyéticas humanas, mantiene las células madre hematopoyéticas humanas y desarrolla, a partir de las células madre hematopoyéticas humanas, una población de células inmunitarias humanas que comprende células inmunitarias humanas diferenciadas funcionales que incluyen células progenitoras mieloides humanas, células mieloides humanas, células dendríticas humanas, monocitos humanos, granulocitos humanos, neutrófilos humanos, mastocitos humanos, timocitos humanos, linfocitos T humanos, linfocitos B humanos y plaquetas humanas.
- 45 En una realización, el ratón mantiene una población de células inmunitarias humanas que es tan diversa en el tipo de célula como la población de células inmunitarias en un ser humano. En una realización, las células inmunitarias humanas se mantienen durante al menos 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 12 meses después del injerto.
- 50 En una realización, el ratón, tras la exposición a un patógeno humano o un antígeno de un patógeno humano, produce una respuesta inmunitaria celular y/o humoral que modeliza la infección de un ser humano expuesto al patógeno. El patógeno humano es un patógeno que no infecta un ratón de tipo silvestre. En otra realización, 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 modeliza una respuesta inmunitaria que un ser humano produce en respuesta al patógeno. En una realización, el patógeno es un virus, una micobacteria, un hongo o una bacteria. En realizaciones específicas, el patógeno es un virus de la gripe humana o porcina o aviar, *S. typhi* o *M. tuberculosis*.
- 55 Otras aplicaciones y realizaciones de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia al leer esta

divulgación.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 muestra la infección por *S. typhi* en ratones injertados inactivados para RAG, inactivados para Il2rg e inactivados para RAG, inactivados para Il2rg, hIL-3/hGM-CSF diez días después de la infección. Grupos experimentales: (1) Injertados: $n = 9$ (4 m/m, 5 h/m); injerto en sangre = 6,5 – 16,7 %; (2) Control: $n = 8$; injerto en sangre = 0,04 – 0,4 % (refleja el fondo de la citometría de flujo; los ratones no recibieron injerto).
- 10 La figura 2 muestra la infección por *S. typhi* en bazo de ratones inactivados para RAG KO, inactivados para Il2rg una semana después de la infección con 1×10^3 de *S. typhi*.
- La figura 3 muestra la infección por *S. typhi* en bazo e hígados de ratones inactivados para RAG, inactivados para Il2rg 4 semanas después de la infección con 1×10^4 de *S. typhi*, en el que se injertó a los ratones células de hígado fetal positivas para CD34.
- 15 La figura 4 muestra la infección por *S. typhi* en vesículas biliares de ratones inactivados para RAG, inactivados para Il2rg 4 semanas después de la infección con 1×10^4 de *S. typhi*, en el que se injertó a los ratones células de hígado fetal positivas para CD34.
- La figura 5 (a)-(d) muestra los resultados de los estudios de validación de la expresión de hGM-CSF en ratones injertados con hIL-3/hGM-CSF.
- 20 La figura 5(e) muestra una estrategia de humanización en un locus de IL-3/GM-CSF de ratón.
- La figura 6(a)-(e) muestra los resultados de estudios pulmonares de ratones injertados con (hIL-3/hGM-CSF) humanizado.
- La figura 6(f), (g) muestra los resultados de ELISA para la producción de IL-3 (f) y GM-CSF (g) de ratón y humanos por esplenocitos activados.
- 25 La figura 7(a) muestra una tinción PAS de secciones de tejido pulmonar de ratones m/m o h/h KI no injertados o injertados; (b) la cuantificación de proteínas totales en el fluido de LBA de ratones h/h KI no injertados (no) o injertados o ratones m/m de control ($n = 6$ por grupo).
- La figura 8(a) muestra la expresión de Hprt humana normalizada para Hprt de ratón; (b) la expresión de IFN γ humano normalizado respecto a Hprt de ratón; (c) la expresión de IFN γ humano normalizado respecto a Hprt humana.
- 30 La figura 8(d) muestra el análisis por citometría de flujo de células de médula ósea humana de ratones hIL-3/GM-CSF h/m KI injertados en equilibrio; (e) análisis por citometría de flujo de células sanguíneas humanas de ratones m/m o h/m KI injertados con SC 72 horas después de dos inyecciones i.p. de LPS; (f) frecuencia de células sanguíneas CD14 $^{+}$ humanas en ratones m/m o h/m KI injertados 72 horas después de las inyecciones de LPS; (g) ELISA de IL-6 humana en sueros de ratones m/m o h/m KI injertados 2-3 horas después de la primera (arriba) y segunda (abajo) inyecciones de LPS.
- 35 La figura 9(a) muestra la frecuencia de linfocitos T humanos (hCD45+hCD3 $^{+}$) en el pulmón; (b) la distribución de los linfocitos T CD4 y CD8 humanos en el pulmón; (c) la proporción de linfocitos T CD4 y CD8 en el pulmón; (d) análisis por citometría de flujo de esplenocitos de ratones BALB/c, ratones m/m injertados y ratones h/m KI injertados cuatro semanas después de la infección con BCG; (e) análisis por RT-PCR cuantitativa de la expresión génica de IFN γ humano (izquierda) y TNF α (derecha) en tejido pulmonar de ratones BALB/c, ratones m/m (no) no injertados, ratones m/m injertados y ratones h/m KI injertados cuatro semanas después de la infección con BCG.
- 40 La figura 9(f) muestra la tinción DiffQuick $^{\text{TM}}$ de células de LBA de ratones m/m o h/h KI no injertados; aumento de 400x; (g) tinción PAS de secciones de tejido pulmonar de ratones m/m o h/h KI no injertados; aumento de 400x.
- La figura 10(a) muestra la tinción con hematoxilina y eosina (H y E) de secciones de tejido pulmonar de ratones h/m KI injertados cuatro semanas después de la infección con BCG; aumento 100x (izquierda) y 200x (derecha);
- 45 (b) secciones de tejido pulmonar teñidos para CD45, CD3, CD68 humanos de ratones h/m KI injertados cuatro semanas después de la infección con BCG; aumento de 200x.
- La figura 11 (a) muestra el análisis por RT-PCR de la expresión de TPO (*mTpo*) de ratón y TPO de ser humano (hTPO) en diferentes tejidos de un ratón Rag2 $^{-/-}$ γ c $^{-/-}$ TPO $^{h/m}$; (b) análisis por RT-PCR de la expresión de *mTpo* y hTPO en hígado, riñón y células estromales multipotenciales mesenquimatosas (CEM) de ratones Rag2 $^{-/-}$ γ c $^{-/-}$ TPO $^{h/m}$, TPO $^{h/m}$ y TPO $^{h/h}$; (c) concentraciones de proteínas TPO humanas y de ratón medidas mediante ELISA en suero de ratones TPO $^{m/m}$, TPO $^{h/m}$ y TPO $^{h/h}$.
- 50 La figura 11 (d) muestra una construcción de direccionamiento para la sustitución del gen mTPO por el gen de hTPO.
- 55 La figura 12(a) muestra el análisis FACS de células CD45 $^{+}$ humanas y de ratón en médula ósea de ratones Rag2 $^{-/-}$ γ c $^{-/-}$ TPO $^{h/m}$ y TPO $^{h/h}$ de 3 a 4 meses después del injerto con células CD34 $^{+}$ humanas; (b) porcentajes de las células CD45 $^{+}$ humanas en la médula ósea de 3 a 4 meses (izquierda) o de 6 a 7 meses (derecha) después del trasplante; (c) número absoluto de células CD45 $^{+}$ humanas en la médula ósea de los mismos animales que en (b).
- 60 La figura 12(d) muestra los porcentajes de las células CD45 $^{+}$ humanas en la médula ósea de ratones Rag2 $^{-/-}$ γ c $^{-/-}$ TPO $^{m/m}$ y TPO $^{h/h}$, injertados con células CD34 $^{+}$ humanas aisladas de sangre de cordón umbilical (SC) o de hígado fetal (HF).
- La figura 13(a) muestra el recuento de plaquetas en la sangre de ratones Rag2 $^{-/-}$ γ c $^{-/-}$ TPO $^{m/m}$, TPO $^{h/m}$ y TPO $^{h/h}$ adultos no injertados; (b) análisis FACS representativo de plaquetas (mCD61 $^{+}$) de ratón y (hCD41a $^{+}$) humanas en la sangre de ratones Rag2 $^{-/-}$ γ c $^{-/-}$ TPO $^{m/m}$ y TPO $^{h/h}$ de 3 a 4 meses después del injerto; (c) quimerismo de plaquetas humanas, determinado por FACS, en ratones TPO $^{m/m}$ y TPO $^{h/h}$; (d),(e) recuento de plaquetas (mCD61 $^{+}$, 20d) de ratón y (hCD41a $^{+}$, 20e) humanas en la sangre de receptores de TPO $^{m/m}$ y TPO $^{h/h}$; (f) porcentajes de megacariocitos

humanos (CD41a⁺) entre las células CD45⁺ humanas de la médula ósea.

La figura 13(g),(h) muestra los porcentajes de las células CD45⁺ humanas en la sangre y en el bazo de ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{m/m} y TPO^{h/h}; (i) proporciona celularidad total del timos de receptores de TPO^{m/m} y TPO^{h/h} injertados.

La figura 14(a) muestra el análisis FACS de poblaciones de células mieloides humanas en médula ósea y sangre de ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{m/m} y TPO^{h/h} de 3 a 4 meses después del injerto; (b) poblaciones mieloides totales (células CD33⁺); (c) granulocitos (CD33⁺CD66^{hi}); (d) tinción DiffQuick™ de células hCD45⁺SSC^{hi}CD33⁺CD66^{hi} purificadas a partir de la médula ósea de receptores de TPO^{h/h}; (e) monocitos (CD33⁺CD66^{lo}CD14⁺); (f),(g) análisis de las poblaciones de células mieloides humanas con respecto al quimerismo de células CD45⁺ humanas en la sangre de receptores de Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{m/m} y TPO^{h/h}; (f) los granulocitos (CD66⁺); (g) monocitos (CD14⁺).

La figura 15(a) muestra el análisis FACS de células madre y progenitoras Lin⁻ Sca1⁺ c-Kit⁺ de ratón en la médula ósea de ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{m/m} y TPO^{h/h} no injertados en comparación con ratones silvestres para TPO (TPO^{m/m}) Rag2^{-/-}γc^{-/-}; (b) análisis cuantitativo de los resultados presentados en (a); (c) análisis FACS de células CD34⁺CD38⁻ humanas en la médula ósea de ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{m/m} y TPO^{h/h} de 3 a 4 meses después del injerto; (d) análisis cuantitativo de los porcentajes de las células CD38⁻ en la población de células CD45⁺CD34⁺ humanas en ratones receptores de TPO^{m/m} y TPO^{h/h}; (e) células CD34⁺CD38⁻ humanas en la médula ósea de los mismos ratones que en 15(d); (f),(g) ensayo de formación de colonias en metilcelulosa con células CD45⁺CD34⁺ humanas purificadas de receptores de Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{m/m} y TPO^{h/h}; (f) es UFC-GEMM, (g) es UFB-E (negro), UFC-G (blanco), UFC-M (gris) y UFC-GM (línea de puntos); (h) quimerismo de células CD45⁺ humanas en el trasplante secundario de células CD45⁺CD34⁺ humanas de ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{m/m} y TPO^{h/h} en ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-} neonatos.

Descripción detallada

La invención no está limitada a las realizaciones particulares descritas, sino que se define mediante las reivindicaciones concedidas.

A menos que se especifique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento incluyen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la cual pertenece la invención. Aunque en la puesta en práctica o el uso de la invención también se pueden usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos, a continuación, se describen realizaciones, métodos y materiales particulares.

Las formas en singular "un", "uno" y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a "un gen" incluye una pluralidad de dichos genes y la referencia a "el gen inactivado" incluye la referencia a una o más inactivaciones y equivalentes de las mismas.

Ratones modificados que soportan las células inmunitarias humanas: ratones hIL-3/GM-CSF

Los ratones con componentes del sistema inmunitario humano (ratones HIS) suponen una gran promesa para el estudio del sistema inmunitario humano *in vivo* y para analizar las vacunas humanas y analizar y desarrollar fármacos para tratar enfermedades y trastornos humanos. Los ratones HIS se generan mediante el trasplante de una cepa de ratón con inmunodeficiencia grave (tal como, ratones inactivados para el receptor gamma de la interleucina 2 (Il2rg) con inactivación del gen 2 activador de la recombinación (Rag2)) con células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas. En comparación con los primates no humanos, los ratones HIS tienen las ventajas de un modelo animal pequeño, es decir, permiten una experimentación más versátil, son más accesibles a la comunidad de investigación y son éticamente más aceptables que la realización de experimentos con sujetos humanos. Lo que es más importante, los resultados experimentales derivados de ratones HIS podrían ser más relevantes y aplicables a seres humanos, ya que la infección con patógenos específicos de seres humanos y el estudio de las respuestas inmunitarias e inmunopatologías específicas de seres humanos son ahora factibles.

Aunque se ha avanzado mucho en los últimos años, los actuales modelos de ratones HIS tienen varias limitaciones importantes, tales como el escaso desarrollo, mantenimiento y función de linfocitos T y células mieloides humanas. Como consecuencia, rara vez se han observado respuestas inflamatorias e inmunitarias humanas en las superficies mucosas o sólidas respuestas mediadas por linfocitos T humanos, tales como hipersensibilidad de tipo retardado (DTH). De este modo, los actuales ratones HIS no son muy adecuados para estudiar la infección y la patología causada por el grave patógeno humano *Mycobacterium tuberculosis*. De hecho, hasta ahora no se han notificado granulomas, específicamente granulomas que contienen células humanas, una característica distintiva de la respuesta inmunitaria humana a las micobacterias, en ratones HIS (véase, por ejemplo, Manz y col. (2009) Renaissance for mouse models of human hematopoiesis and immunobiology, *Nat. Immunol.* 10:1039-1042).

Los hospedadores ratones HIS actuales no son muy adecuados para simular ciertas infecciones, al menos en parte debido a que los hospedadores ratones HIS actuales presentan un ambiente no fisiológico para las células humanas. Varias citocinas de ratón, por ejemplo, IL-3 y GM-CSF, no actúan sobre los receptores afines humanos. Además, los ratones inactivados para Rag2 inactivados para Il2rg tienen un compartimento mielóide de ratón intacto y las células mieloides humanas podrían tener una desventaja competitiva con respecto a las células hospedadoras. Para superar estas limitaciones, esta divulgación describe la generación de ratones inactivados en citocinas humanas en los que

los genes que codifican las citocinas de ratón se sustituyen por sus homólogos humanos. Los criterios para la sustitución de citocinas son: (1) la citocina de ratón no actúa sobre las células humanas o lo hace débilmente; (2) la citocina humana no actúa sobre las células de ratón, o lo hace débilmente, para conferir una ventaja competitiva a las células humanas; (3) la citocina humana no se produce exclusivamente en las células hematopoyéticas (trasplantadas); (4) la falta de citocina de ratón no es letal para el ratón hospedador, o la citocina KI humana presenta la suficiente reactividad cruzada como para rescatar el fenotipo KO de ratón. La estrategia KI debería permitir una expresión fiel en órganos adecuados y a concentraciones fisiológicas. De manera importante, en ratones KI homocigóticos, las células que expresan el receptor afín humano deben obtener una ventaja competitiva respecto a las respectivas células de ratón.

IL-3 y GM-CSF son dos citocinas cruciales para el desarrollo y la función de las células mieloides. Ninguna citocina presenta reactividad cruzada entre ser humanos y ratón. La IL-3 estimula los progenitores hematopoyéticos tempranos *in vitro*, pero es prescindible para la hematopoyesis en equilibrio *in vivo*. Sin embargo, junto con GM-CSF es necesaria para las respuestas de DTH eficaces *in vivo*. La IL-3 también estimula específicamente la proliferación de los macrófagos alveolares (MA) *in vitro*. El GM-CSF se expresa de forma elevada en el pulmón y es importante para la homeostasis de pulmón *in vivo*, como se demuestra por el hecho de que los ratones inactivados para GM-CSF desarrollan proteinosis alveolar pulmonar (PAP), que se caracteriza por la acumulación de proteínas en el pulmón debido a un aclaramiento defectuoso de tensoactivo. Los macrófagos alveolares de ratones inactivados para GM-CSF tienen un defecto en la diferenciación terminal, lo que conduce al deterioro de la inmunidad innata frente a patógenos en el pulmón. El GM-CSF también estimula la proliferación de MA humanos *in vitro*. Similar a la IL-3, el GM-CSF es en gran parte prescindible para la hematopoyesis en equilibrio, y lo mismo se aplica a los ratones que carecen de ambas citocinas. Por el contrario, el GM-CSF es necesario para las respuestas inflamatorias, tales como la producción de citocinas proinflamatorias por los macrófagos y la movilización y el reclutamiento de monocitos. El GM-CSF también es esencial para la inmunidad protectora contra diversos patógenos, incluyendo *M. tuberculosis*. En particular, los ratones inactivados para GM-CSF infectados con *M. tuberculosis* no desarrollan granulomas, una característica distintiva de la tuberculosis.

Esta divulgación se basa, al menos en parte, en la comprensión de que la generación de ratones hIL-3/GM-CSF KI sería valiosa para soportar la reconstitución y la función de células mieloides humanas, así como las respuestas inmunitarias innatas humanas a patógenos en ratones. Los resultados obtenidos y descritos en esta divulgación con dichos ratones KI demuestran que esta estrategia permite una mejora sustancial respecto a los modelos actuales de ratones HIS en términos de desarrollo de células mieloides humanas, inmunidad de la mucosa pulmonar humana y también la formación de granulomas después de la infección por micobacterias. Estas y otras propiedades beneficiosas de dichos ratones se describen en otra parte en esta divulgación.

La capacidad para estudiar los tejidos humanos en un entorno *in vivo* en ratones ha abierto una amplia gama de posibles vías de investigación. Las principales limitaciones han impedido la aplicación del enfoque y, de estas, una de las deficiencias más importantes ha sido la incapacidad de los factores de ratón para soportar células humanas. De hecho, en el sistema inmunitario, muchos factores esenciales necesarios para el desarrollo y la función de células inmunitarias humanas son específicos para cada especie y el ratón no los puede proporcionar de manera efectiva. Por lo tanto, se decidió seguir una estrategia de sustitución de los genes de ratón con sus homólogos humanos, lo que permite mejorar el desarrollo y la función de las células humanas e inactivar potencialmente los mismos de las correspondientes células de ratón. Mediante la aplicación de este concepto a ratones KI de citocinas humanas, en el presente documento se presenta la prueba de concepto de que la sustitución de los genes inmunitarios en el hospedador ratón con genes humanos mejora los ratones HIS. Específicamente, esta divulgación apoya la idea de que la inapropiada reactividad cruzada de las citocinas entre ratón y ser humano y el tener que competir con las células de ratón, de hecho, limitan el prendimiento del injerto y la función de las células mieloides humanas en los ratones HIS actuales.

Las citocinas humanas pueden liberarse en los ratones HIS mediante inyección intravenosa, por ejemplo, para reforzar la reconstitución de células NK y linfocitos T humanos por medio de inyecciones de complejos de IL-15/IL-15R α e IL-7, respectivamente. Otro enfoque es la inyección hidrodinámica del ADN plasmídico que expresa citocinas humanas, lo que conduce a la expresión transitoria en el hígado. Este enfoque ha sido muy utilizado recientemente para mejorar la reconstitución de CD humanas mediante la liberación hidrodinámica de GM-CSF e IL-4 (véase, Chen *et al.* (2009) Expression of human cytokines dramatically improves reconstitution of specific human-blood lineage cells in humanized mice, *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(51):21783-21788). En contraste con la presente divulgación, no se han notificado respuestas funcionales de células mieloides o respuestas *in vivo* a patógenos en estos ratones. Por último, las citocinas humanas también pueden sobreexpresarse como transgenes en ratones HIS. Este enfoque se ha usado para generar ratones transgénicos (tg) de IL-3/GM-CSF/factor de células madre (SCF) (véase, Nicolini *et al.* (2004) NOD/SCID mice engineered to express human IL-3, GM-CSF and Steel factor constitutively mobilize engrafted human progenitors and compromise human stem cell regeneration, *Leukemia* 18:341-347). En estos ratones, la expresión de citocinas humanas está dirigida por el promotor del citomegalovirus, que conduce a la expresión ubicua. Sin embargo, los ratones His tg para hIL-3/GM-CSF/SCF se ven obstaculizados por la reducción del mantenimiento de las células madre hematopoyéticas humanas en la médula ósea y la mielopoyesis terminal expandida. De nuevo, a diferencia de la presente divulgación, no se describieron la mejora de la función de las células mieloides ni las respuestas *in vivo*. Por el contrario, en el sistema descrito en el presente documento, la expresión fisiológica de los genes específicos en

el estado de equilibrio y la inflamación permite el desarrollo y la función apropiada del tipo celular apropiado únicamente. De manera importante, el enfoque descrito en esta divulgación genera cepas de ratones que se pueden mantener y propagar en condiciones altamente reproducibles y ponerse a disposición de todo el mundo para los estudios.

5 Los ratones hIL-3/GM-CSF KI descritos en esta divulgación representan una mejora considerable respecto a anteriores ratones HIS y los enfoques alternativos descritos anteriormente. En primer lugar, la liberación de IL-3 y GM-CSF humanos mediante la estrategia de KI descrita en el presente documento conduce a la expresión de citocinas a largo plazo, lo que evita la necesidad de inyecciones repetidas de citocinas caras. En segundo lugar, se consigue una expresión fiel en órganos en los que la IL-3 y el GM-CSF se expresan de forma normal. En condiciones fisiológicas, el GM-CSF se expresa principalmente en el pulmón (figura 5a). Por el contrario, la liberación hidrodinámica conduce a la expresión predominante en el hígado y en la circulación. En ambos órganos, el GM-CSF no se expresa en condiciones de equilibrio. En tercer lugar, las cantidades fisiológicas de IL-3 y GM-CSF se expresan en ratones KI en contraste con la liberación por inyección hidrodinámica o la sobreexpresión ubicua en ratones tg para hIL-3/GM-CSF/SCF. Se ha demostrado que los niveles fisiológicos de GM-CSF son importantes para una respuesta inmunitaria protectora contra *M. tuberculosis*. De este modo, los ratones transgénicos con sobreexpresión local de GM-CSF el pulmón muestra formación defectuosa de granulomas y aumento de la susceptibilidad a las *M. tuberculosis*. De forma análoga, la administración intravenosa de GM-CSF también conduce un control alterado de la infección por *M. tuberculosis* en ratones. En cuarto lugar, los ratones hIL-3/GM-CSF KI homocigóticos permiten el deterioro simultáneo del compartimento mielóide de ratón, ya que la IL-3 y el GM-CSF de ratón no se expresan en ratones homocigóticos. Esto conduce a una ventaja competitiva para las células mieloides humanas, como se muestra en la presente divulgación.

25 La tuberculosis causada por la infección con *M. tuberculosis* da lugar a 1,7 millones de muertes al año. Por lo tanto, se necesitan con urgencia nuevas medidas preventivas y terapéuticas eficaces. Aunque los ratones pueden infectarse con *M. tuberculosis*, no representan un modelo ideal para la tuberculosis humana. Esto se debe a las diferencias específicas de especies en la respuesta inmunitaria a *M. tuberculosis*. Por ejemplo, los ratones infectados no desarrollan granulomas bien organizados. Los granulomas son la característica distintiva de la respuesta inmunitaria en seres humanos con tuberculosis y contienen macrófagos activados que se fusionan para formar células epitelioides y gigantes multinucleadas y linfocitos T activados. Los granulomas juegan un papel importante en la limitación de la replicación bacteriana y en el control de propagación de micobacterias. El GM-CSF promueve la diferenciación de MA en células gigantes multinucleadas *in vitro*. Los estudios en ratones transgénicos también revelaron un papel del GM-CSF en la fusión de los macrófagos para formar células gigantes multinucleadas *in vivo*. Adicionalmente, el GM-CSF es esencial para la formación de granulomas después de la infección por micobacterias. La ausencia de granulomas en los ratones inactivados para GM-CSF infectados con *M. tuberculosis* se asocia con un aumento de la replicación bacteriana y una supervivencia reducida. Por último, los seres humanos con PAP, causada por la señalización defectuosa de GM-CSF, muestran una mayor susceptibilidad a las infecciones por micobacterias.

40 Las respuestas inmunitarias humanas anti-micobacterias, en particular la formación de granulomas por células humanas, no se ha informado anteriormente en ratones HIS. Esto es probablemente debido a las débiles respuestas de macrófagos y linfocitos T humanos. En esta divulgación, se detectó una respuesta de linfocitos T específica de antígeno a las micobacterias en una subpoblación de ratones injertados con células humanas. Además, dado el papel prominente del GM-CSF en la biología del granuloma, se ha planteado la hipótesis de que los ratones hIL-3/GM-CSF KI injertados serían un hospedador mejor para soportar la formación de granulomas. De hecho, este fue el caso en al menos una subpoblación de ratones infectados con BCG. De manera importante, los granulomas pulmonares en estos ratones contenían linfocitos T humanos y macrófagos humanos, aunque los granulomas tenían la arquitectura suelta típica de los granulomas de ratón. Los esfuerzos futuros deberían estar dirigidos a reforzar las respuestas de linfocitos T y macrófagos humanos en ratones HIS. Esto debería conducir al desarrollo de un modelo animal pequeño que permita el estudio de respuestas inmunitarias humanas a *M. tuberculosis in vivo*. Los ratones hIL-3/GM-CSF KI también podrían ser útiles en otras situaciones para estudiar la respuesta inmunitaria humana *in vivo*. Esto incluye la infección con patógenos pulmonares, autoinmunidad y cánceres humanos. En resumen, los ratones hIL-3/GM-CSF KI presentados en la presente divulgación representan un modelo en ratón HIS considerablemente mejorado que debería servir como una herramienta versátil para futuros estudios.

55 **Ratones modificados que soportan las células inmunitarias humanas: hTPO**

Las células madre hematopoyéticas (CMH) se caracterizan por dos propiedades principales: autorrenovación durante toda la vida y capacidad de diferenciación en todas las células del linaje hematopoyético maduras. Para asegurar la homeostasis del conjunto de CMH, se cree que tras la división celular, las CMH generan una CMH funcional, mientras que la otra célula descendiente podría sufrir un programa altamente organizado de diferenciación y expansión celular, durante el cual se producen múltiples linajes de progenitores comprometidos, y, en última instancia, células diferenciadas terminalmente.

65 La hematopoyesis de ratón se ha estudiado ampliamente durante las últimas décadas, lo que lleva a la identificación y la caracterización funcional de poblaciones celulares definidas inmunofenotípicamente, altamente enriquecidas en células madre y progenitoras *in vivo*. Sin embargo, los estudios experimentales prospectivos *in vivo* de hematopoyesis

humana se han visto limitados por restricciones éticas prácticas y obvias.

Para evitar esta limitación, se han desarrollado varios modelos de xenotrasplantes para estudios de hematopoyesis humana *in vivo*. De estos, el trasplante de células hematopoyéticas humanas en ratones inmunodeficientes se ha establecido ampliamente en los laboratorios de hematopoyesis experimentales. Los modelos más usados hoy en día se basan en las cepas de ratones BALB/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} o NOD-SCID γc^{-/-}. Ambas cepas son muy inmunodeficientes, que carecen de linfocitos B, T y células NK, y sus antecedentes genéticos son permisivos para el injerto y diferenciación hematopoyética humana. Tras el trasplante de células progenitoras y madre hematopoyéticas CD34⁺ humanas, la mayoría de las poblaciones hematopoyéticas humanas (incluidas, linfocitos B, linfocitos T, monocitos, células dendríticas, eritrocitos y plaquetas) pueden desarrollarse y son detectables en estos modelos. Sin embargo, en esos animales quiméricos, hay una tendencia hacia el desarrollo linfoide con recuentos de linfocitos B inicialmente altos que normalmente representan hasta el 80 % de las células humanas, el desarrollo mielo-monocítico es menor, y los niveles de injerto por lo general comienzan a declinar 4-6 meses después del trasplante. Además, el xenoinjerto de células humanas en ratones requiere trasplante de un gran número de células en comparación con un número suficiente para el injerto óptimo de células madre y progenitoras hematopoyéticas de ratón en ratones, o de células humanas en seres humanos, respectivamente. Adicionalmente, a diferencia de las CMH de ratón trasplantadas en ratones receptores, las CMH humanas no se expanden, ni se mantienen, en el entorno del ratón xenogénico. De este modo, las características del ratón no proporcionan un ambiente óptimo para estudiar la fisiología de las CMH humanas. Esto podría deberse a la reactividad cruzada limitada, o ausencia de ella, de los factores de crecimiento, necesarios para soportar la función y el mantenimiento de las CMH.

La trombopoyetina (TPO) se identificó inicialmente como factor de crecimiento que estimula el desarrollo de megacariocitos y plaquetas. La TPO se produce de forma constitutiva en el hígado y los riñones, y se libera en la circulación de la sangre. El receptor de TPO, c-Mpl, es expresado por las células madre y progenitoras hematopoyéticas en la médula ósea. C-Mpl también se expresa en las plaquetas circulantes. Sin embargo, la unión de TPO a las plaquetas no se activa ninguna vía de señalización. De este modo, los trombocitos actúan como sumidero o secuestrantes de TPO y, a través de este mecanismo, contribuyen a la regulación negativa de la trombopoyesis. Posteriormente, la TPO se reconoce por su importante función como soporte de la expansión y la autorrenovación de las CMH. La deficiencia de TPO conduce a un número reducido de CMH en ratones adultos y se necesita la presencia de TPO para mantener las CMH adultas en reposo. Adicionalmente, se necesita TPO como soporte de la expansión posttrasplante de las CMH, necesario para reponer el compartimiento hematopoyético de los hospedadores irradiados. Curiosamente, se ha demostrado que las células osteoblásticas que participan en la formación del nicho de las CMH en la médula ósea producen TPO, crucial para la función y el mantenimiento de las CMH.

Aunque la TPO de ratón y humana presentan ambas reactividad cruzada con los respectivos receptores afines cuando se usan a dosis suprafisiológicas *in vitro*, la afinidad y la actividad biológica podrían diferir cuando la citocina actúa a dosis fisiológicas limitantes, en el contexto de un entorno *in vivo*. De este modo, la TPO de ratón podría no proporcionar un estímulo adecuado para el receptor c-Mpl humano *in vivo*, y, por lo tanto, podría ser responsable de las propiedades defectuosas de las CMH humanas en el entorno del ratón. Para corregir este defecto potencial, el gen que codifica la TPO de ratón se sustituyó por su homólogo humano en ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-}.

Esta divulgación se basa, se basa, al menos en parte, en la comprensión de que la generación de ratones hTPO KI en un contexto de RAG2^{-/-}γc^{-/-} sería valiosa para soportar la reconstitución y función de células mieloides humanas, así como las respuestas inmunitarias innatas humanas a patógenos en ratones, en los propios ratones a y en la progenie de tales ratones criados con ratones hIL-3/GM-CSF. Los resultados obtenidos de ratones hTPO KI en un contexto RAG2^{-/-}γc^{-/-} se describen en esta divulgación. Los ratones hTPO KI homocigóticos tenían niveles aumentados significativamente de injertos humanos en la médula ósea y la diferenciación de linaje múltiple de las células hematopoyéticas se mejoró respecto a ratones mTPO, mostrando los ratones hTPO KI un aumento de la relación entre los linajes mielomonocítico frente a linfoide. Tanto el número como la capacidad de autorrenovación de las células madre y progenitoras humanas mejoraron, como se demuestra por el trasplante de serie. De este modo, entre otras aplicaciones, los ratones hTPO KI son útiles para la propagación de las células humanas mediante trasplante en serie.

Cría de un ratón hIL-3/GM-CSF y un ratón hTPO

Cabe esperar que la progenie de los ratones hIL-3/GM-CSF y hTPO descritos en el presente documento tengan al menos las mismas características relevantes y presenten los mismos beneficios que las líneas parentales (es decir, ratones hIL-3/GM-CSF y ratones hTPO). Por ejemplo, las poblaciones de células humanas de cualquier cepa parental, o de ambas, o dicha progenie se puede aislar y trasplantar en serie en un ratón hTPO o una progenie de un ratón hIL-3/GM-CSF y hTPO. De este modo, en un aspecto, se proporciona un ratón modificado genéticamente que es una progenie de un ratón hIL-3/GM-CSF y un ratón hTPO como se describe en el presente documento (incluyendo la progenie criada hasta la homocigosidad con respecto a cada gen relevante) y en el que el ratón modificado genéticamente exhibe los beneficios y las características tanto de un ratón hIL-3/GM-CSF como de un ratón hTPO. En un aspecto, se proporciona dicho ratón de la progenie que comprende un sistema inmunitario anulado (por ejemplo, un ratón irradiado), y es adecuado para el injerto y/o el trasplante en serie de cualquier ratón injertado (por ejemplo, un ratón injertado como se describe en el presente documento).

Injerto en ratones modificados genéticamente

Un ratón modificado genéticamente de acuerdo con la invención encuentra un uso como receptor de células hematopoyéticas humanas, que es capaz de desarrollar células inmunitarias humanas a partir de células hematopoyéticas humanas injertadas. En una realización, las células hematopoyéticas humanas o células progenitoras y madre hematopoyéticas humanas (CPMH) se colocan (injertan) en un ratón modificado genéticamente e irradiado de acuerdo con la invención. Las células hematopoyéticas humanas o células madre hematopoyéticas humanas dan lugar en el ratón modificado genéticamente a una célula seleccionada de una célula positiva para CD34, una célula madre hematopoyética humana, una célula hematopoyética humana, una célula precursora mieloide, una célula mieloide, una célula dendrítica, un monocito, un neutrófilo, un mastocito y un sistema hemato-linfoide humano (que incluye células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas, células progenitoras mieloides humanas, células mieloides humanas, células dendríticas humanas, monocitos humanos, granulocitos humanos, neutrófilos humanos, mastocitos humanos, timocitos humanos, linfocitos T humanos, linfocitos B humanos, plaquetas humanas), y una combinación de los mismos.

Los ratones modificados genéticamente pueden ser irradiados para eliminar las células hematopoyéticas endógenas que pueden estar presentes y se puede injertar en el ratón cualquier fuente adecuada de células hematopoyéticas humanas. Una fuente adecuada de células hematopoyéticas conocidas en la materia son las células sanguíneas de cordón umbilical humano, células positivas para CD34. Otra fuente de células hematopoyéticas es el hígado fetal humano.

En una realización, el injerto de un ratón de acuerdo con la invención con las células hematopoyéticas humanas da como resultado un ratón que presenta un número mayor de células hematopoyéticas humanas que un ratón inmunocomprometido que carece de la humanización de un gen de TPO, carece de humanización de un gen de IL-3 y de GM-CSF, o carece de humanización de un gen de TPO y un gen de IL-3 y GM-CSF.

En una realización, el injerto de un ratón de acuerdo con la invención con las células hematopoyéticas humanas da resultado un ratón que presenta un número mayor de células sanguíneas humanas (por ejemplo, células hematopoyéticas maduras) en comparación con un ratón inmunocomprometido que carece de una o más humanizaciones. En una realización específica, las células hematopoyéticas humanas se seleccionan de células positivas para CD34 humanas, células madre hematopoyéticas, células hematopoyéticas, células precursoras mieloides, células mieloides, células dendríticas, monocitos, granulocitos, neutrófilos, mastocitos y un sistema hemato-linfoide humano (que incluye células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas, células progenitoras mieloides humanas, células mieloides humanas, células dendríticas humanas, monocitos humanos, granulocitos humanos, neutrófilos humanos, mastocitos humanos, timocitos humanos, linfocitos T humanos, linfocitos B humanos, plaquetas humanas), y una combinación de los mismos.

Aplicaciones no limitantes de ratones injertados modificados genéticamente

Un ratón modificado genéticamente injertado con células hematopoyéticas humanas es un animal útil en el que estudiar los patógenos que normalmente no infectan a ratones. Un ejemplo de ello 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, ciprofloxacina, cotrimoxazol, ertapenem, imipenem, fluoroquinolonas (por ejemplo, ciprofloxacina, gatifloxacina, ofloxacina), estreptomina, 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 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 vacuna en comparación con un control no inoculado con la vacuna pero infectado con *S. typhi*.

Un ratón modificado genéticamente e injertado de acuerdo con la invención es útil para hacer un ratón que se pueda infectar por un patógeno humano que no infecta a ratones. Por ejemplo, el ratón es útil como animal no humano infectable por *S. typhi*. En una realización, el ratón modificado genéticamente e injertado muestra un injerto mejorado de las células humanas en comparación con un ratón injertado que carece de la modificación o modificaciones genéticas, en el que la mejora es suficiente para mantener una infección por *S. typhi*. En una realización específica, el mantenimiento de una infección por *S. typhi* incluye la capacidad de *S. typhi* para reproducirse en el ratón. En una realización específica, la infección por *S. typhi* incluye la capacidad del ratón infectado para reproducir *S. typhi*. 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*.

5 También se proporciona un método para identificar un agente anti-*S. typhi*, en el que el método emplea un ratón como se describe en el presente documento que es infectable por *S. typhi*. Los ratones de tipo silvestre, y otros ratones inmunodeprimidos conocidos (por ejemplo, ratones inactivados para los genes RAG1/RAG2) no son capaces de ser infectados por *S. typhi*.

10 Se proporciona un ratón modificado genéticamente que comprende una inactivación del gen *Il2rg* y una inactivación del gen *RAG* (por ejemplo, una inactivación del gen *RAG 2*) (primer tipo) y que comprende también una sustitución del gen de *IL-3* endógeno de ratón con un gen de *IL-3* humana y el gen de *GM-CSF* endógeno de ratón con un gen de *GM-CSF* humano (segundo tipo), en el que el ratón modificado genéticamente cuando está injertado con células hematopoyéticas humanas es capaz de ser infectado con *S. typhi*.

15 Los datos mostrados en la figura 1 son representativos del primero y el segundo tipo de ratón. Las modificaciones genéticas de los ratones en la figura 1 comprenden: (a) una inactivación del gen *RAG* de ratón; y (b) una inactivación del gen *Il2rg* de ratón. Los ratones de la figura 1 también comprenden un injerto de células hematopoyéticas humanas. Los ratones se pueden modificar adicionalmente mediante otras dos modificaciones para crear el segundo tipo de ratón, que son: (c) la sustitución de un gen de *IL-3* de ratón endógeno con un gen de *IL-3* humana; y (d) la sustitución de un gen de *GM-CSF* de ratón con un gen de *GM-CSF* humano.

20 Las figuras 2, 3 y 4 se obtuvieron usando solo el primer tipo de ratones modificados (que comprenden las modificaciones (a) una inactivación del gen *RAG* de ratón; y (b) una inactivación del gen *Il2rg* de ratón; y el injerto con células hematopoyéticas humanas).

25 En diversas realizaciones, el ratón modificado genéticamente infectado por *S. typhi* comprende una infección productiva de *S. typhi*. En una realización, el ratón es capaz de albergar y reproducir *S. typhi* en una o más de sus células. En una realización, el ratón es capaz de mantener un título o nivel de *S. typhi* en su sangre o 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*.

30 En una realización, el método comprende la administración de un agente a un ratón modificado genéticamente de acuerdo con la invención, en el que el ratón modificado genéticamente está infectado con *S. typhi*, la detección de un nivel de *S. typhi* en sangre o en un tejido de un ratón después de la administración del agente, y, opcionalmente, la determinación de si la administración del agente disminuye el nivel de *S. typhi* en la sangre o el tejido del ratón. En una realización, el agente es una vacuna. En otra realización, el agente es un antibiótico o un agente que se sospecha que tiene propiedades antibióticas. En una realización, El agente es una proteína de unión a antígeno, en una realización específica un anticuerpo. En una realización, el agente es un producto farmacéutico aprobado para su uso en un ser humano.

35 En una realización, El método comprende la infección de un ratón modificado genéticamente e injertado con una cantidad conocida de *S. typhi*, la administración de un agente al ratón infectado, y la determinación de la cantidad de *S. typhi* en el ratón modificado genéticamente e injertado tras la administración del agente. En una realización, se determina que el agente es un agente anti-*S. typhi* si reduce la cantidad de *S. typhi* en sangre o un tejido del ratón en al menos la mitad después de una sola administración o dos o más administraciones del agente durante un período de tiempo seleccionado.

40 En un aspecto, se proporciona un método para determinar si un aislado o cepa de *S. typhi* de interés es resistente a un fármaco o resistente a múltiples fármacos, que comprende la administración de un fármaco o una combinación de fármacos empleados para tratar *S. typhi* a un ratón modificado genéticamente e injertado de acuerdo con la invención, en el que el ratón está infectado con el aislado o cepa de *S. typhi* de interés. El método incluye determinar el efecto, si lo hay, del fármaco o combinación de fármacos sobre (a) el título del aislado o cepa de *S. typhi* de interés en la sangre o el tejido del ratón en un punto en el tiempo después de la administración del fármaco o combinación de fármacos, (b) la capacidad del aislado o cepa de *S. typhi* de interés para mantener una infección en el ratón o un nivel de *S. typhi* en un tejido del ratón después de una o más de administraciones del fármaco o combinación de fármacos, o (c) la capacidad del aislado o cepa de *S. typhi* de interés para reproducirse en el ratón en un punto en el tiempo después de la administración del fármaco o combinación de fármacos. En una realización específica, el fármaco se selecciona del grupo que consiste en amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cloranfenicol, ciprofloxacina, cotrimoxazol, ertapenem, imipenem, fluoroquinolonas (por ejemplo, ciprofloxacina, gatifloxacina, ofloxacina), estreptomycin, sulfadiazina, sulfametoxazol, tetraciclina y una combinación de los mismos. En una realización específica, 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 la exposición productora de infección a *S. typhi*.

45 En diversos aspectos y realizaciones, el nivel de *S. typhi* en sangre o tejido se puede medir mediante la determinación del número de unidades formadoras de colonias por unidad (por ejemplo, peso o volumen) de sangre o tejido.

En una realización, un ratón injertado con células hematopoyéticas humanas modificado genéticamente de acuerdo con la invención tiene un nivel de *S. typhi*, según lo medido por unidades formadoras de colonias (ufc), de al menos de 100, 1.000 o 10.000 veces respecto a un ratón que no está injertado con células hematopoyéticas humanas.

5 Métodos y composiciones útiles para determinar la eficacia de una vacuna anti-*S. typhi*. En un aspecto, se proporciona un método para determinar la eficacia de una vacuna anti-*S. typhi*, que comprende la exposición de un ratón modificado genéticamente e injertado de acuerdo con la invención a una vacuna anti-*S. typhi* y, seguidamente, exponer el ratón modificado genéticamente e injertado a *S. typhi* y determinar si o en qué medida el ratón modificado genéticamente e injertado se puede infectar con *S. typhi*.

10 En una realización, La vacuna anti-*S. typhi* comprende una proteína de la superficie celular de *S. typhi* o un fragmento inmunógeno de la misma. En una realización, la vacuna comprende una fracción de membrana de una cepa de *S. typhi*. En una realización, La vacuna comprender una proteína recombinante de *S. typhi* o un fragmento inmunógeno de la misma. En una realización, la vacuna puede comprender un vector de expresión que codifica una proteína de *S. typhi* o un fragmento inmunógeno de la misma. En una realización, la vacuna comprende una cepa de *S. typhi* o mezcla inactivada de cepas de *S. typhi*.

15 Los ratones modificados genéticamente e injertados descritos en esta divulgación son también útiles para modelizar infecciones por patógenos humanos más estrechamente que los ratones existentes. Por ejemplo, la infección por *M. tuberculosis*. Los ratones modificados genéticamente e injertados descritos en el presente documento son útiles para modelizar una infección humana de una micobacteria, por ejemplo, proporcionando un modelo en ratón de *M. tuberculosis* que desarrolla granulomas, incluyendo granulomas que comprenden células inmunitarias humanas y granulomas bien definidos. Los métodos para las pruebas de fármacos y vacunas mencionadas en relación con la infección por *S. typhi* de ratones modificados genéticamente e injertados descritos también son aplicables a aplicaciones de *M. tuberculosis*, por ejemplo, identificar cepas resistentes a fármacos, analizar la eficacia de una vacuna para *M. tuberculosis*, analizar agentes anti-*M. tuberculosis*, medie las ufc en respuesta a un agente anti-*M. tuberculosis*, etc.

20 Los ratones modificados genéticamente e injertados descritos en esta divulgación son también útiles para modelizar una neoplasia maligna hematopoyética humana que se origina a partir de una célula hematopoyética humana temprana, *por ejemplo* de una célula hematopoyética o progenitora humana. Otras aplicaciones de los ratones genéticamente modificados e injertados descritos en esta divulgación serán evidentes para los expertos en la materia tras leer esta divulgación.

35 Trombopoyetina e injerto

La trombopoyetina (TPO) se identificó inicialmente como factor de crecimiento que estimula el desarrollo de megacariocitos y plaquetas (Wendling, F. y col. (1994) cMpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis, *Nature* 369:571-574; Kaushansky, K. y col. (1994) Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin, *Nature* 369:568-571; Lok, S. y col. (1994) Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production *in vivo*, *Nature* 369:565-568; de Sauvage, F.J. y col. (1994) Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand, *Nature* 369:533-538; Bartley, T.D. y col. (1994) Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl, *Cell* 77:1117-1124; Kaushansky, K. (1998) Thrombopoietin, *N Engl J Med* 339:746-754; Kaushansky, K. (2005) The molecular mechanisms that control thrombopoiesis, *J Clin Invest* 115:3339-3347; Kaushansky, K. (2008) Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis, *Blood* 111:981-986).

40 La TPO se produce de forma constitutiva en el hígado y los riñones, y se libera en la circulación de la sangre. El receptor de TPO, c-Mpl, es expresado por las células madre y progenitoras hematopoyéticas en la médula ósea. C-Mpl también se expresa en las plaquetas circulantes. Sin embargo, la unión de TPO a las plaquetas no se activa ninguna vía de señalización. De este modo, los trombocitos actúan como sumidero o secuestrantes de TPO y, a través de este mecanismo, contribuyen a la regulación negativa de la trombopoyesis (Kuter, D.J. & Rosenberg, R.D. (1995) The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit, *Blood* 85:2720-2730). Posteriormente, la TPO se reconoce por su importante función como soporte de la expansión y la autorrenovación de las CMH (Fox, N., y col. (2002) Thrombopoietin expands hematopoietic stem cells after transplantation, *J Clin Invest* 110, 389-3894; Kirito, K. y col. (2003) Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells, *Blood* 102:3172-3178).

50 La deficiencia de TPO conduce a un número reducido de CMH en ratones adultos y se necesita la presencia de TPO para mantener las CMH adultas en reposo (Yoshihara, H. y col. (2007) Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche, *Cell Stem Cell* 1, 685-697; Qian, H. y col. (2007) Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells, *Cell Stem Cell* 1:671-684). Adicionalmente, se necesita TPO como soporte de la expansión postrasplante de las CMH, necesario para reponer el compartimiento hematopoyético de los hospedadores irradiados. Curiosamente, se ha demostrado que las células osteoblásticas que participan en la formación del "nicho" de las CMH en la médula ósea producen TPO, crucial

para la función y el mantenimiento de las CMH.

Aunque la TPO de ratón y humana presentan ambas reactividad cruzada con los respectivos receptores afines cuando se usan a dosis suprafisiológicas *in vitro*, la afinidad y la actividad biológica podrían diferir cuando la citocina actúa a dosis fisiológicas limitantes, en el contexto de un entorno *in vivo*. Los inventores plantearon la hipótesis de que la TPO de ratón podría no proporcionar un estímulo adecuado para el receptor c-Mpl humano *in vivo*, y, por lo tanto, podría ser responsable de las propiedades defectuosas de las CMH humanas en el entorno del ratón. Para corregir este defecto potencial, los inventores sustituyeron el gen que codifica la TPO de ratón por su homólogo humano en ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-}. Se planteó la hipótesis de que un ratón de este tipo tendría una capacidad mejorada para mantener la diferenciación y la función de un sistema hemato-linfopoyético humano.

Se ha conseguido un progreso significativo en el desarrollo de los ratones que mantienen la diferenciación y la función del sistema hemato-linfopoyético humano desde la publicación de los primeros modelos hace más de dos décadas. Sin embargo, sigue habiendo varias limitaciones, incluyendo (i) el injerto transitorio de células humanas, que no tienen la duración de la vida de los ratones receptores, (ii) el sesgo no fisiológico hacia linaje linfóide y la mala diferenciación de las células mieloides, y (iii) la variabilidad de los niveles del injerto entre animales diferentes, incluso cuando los grupos de ratones se trasplantan con células de un único donante humano. Estas limitaciones podrían deberse a la localización no fisiológica de las células humanas, la xenorreactividad residual del hospedador inmunodeficiente, la composición diferente de las células hemato-linfoides en las especies de ratón y de ser humano y/o deberse a la falta (o insuficiencia) de reactividad cruzada entre ratones y seres humanos de los factores que soportan la hematopoyesis, lo que da lugar al soporte preferente de las células de ratón. De este modo, proporcionar niveles fisiológicos de factores de crecimiento humanos y eliminar los respectivos homólogos en ratón en el hospedador podría favorecer aún más al desarrollo y la supervivencia de las poblaciones de células humanas. En este caso, se describe una nueva cepa de ratones receptores en los que se humanizó el gen que codifica la trombopoyetina, una citocina con funciones importantes en el mantenimiento y la autorrenovación de las células madre hematopoyéticas.

Tras el injerto de estos ratones con trombopoyetina humanizada con células progenitoras y madre hematopoyéticas CD34⁺, se observó una mejora significativa en comparación con modelos previamente disponibles en las tres limitaciones mencionadas anteriormente: el quimerismo de la médula ósea fue mayor y se mantuvo durante al menos seis meses; se potenció el multilineaje, en particular la diferenciación del linaje mielóide; y se redujo la variabilidad en los niveles de injerto.

Una diferencia importante entre los sistemas inmunitario de ratón y humano es la fracción de granulocitos presente en la sangre. Los linfocitos son preponderantes en los ratones, mientras que la sangre humana es rica en granulocitos, una diferencia de especie poco clara en su significado. Curiosamente, la presencia de TPO humana mejoró la diferenciación de los granulocitos humanos (figura 14). De este modo, la presencia de TPO humana en ratones receptores favorece un equilibrio entre los granulocitos y los linfocitos que refleja mejor el estado fisiológico humano, un hallazgo posiblemente debido a un mejor mantenimiento y/o diferenciación de las células progenitoras mieloides humanas.

De forma más importante, los resultados muestran que la humanización de TPO favorece el mantenimiento del receptor secundario, repoblando las células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas en el entorno del ratón (figura 15). Por tanto, el ratón Rag2^{-/-}γc^{-/-}TPO^{h/h} representa un modelo novedoso para estudiar varios aspectos de la función de las células madre y progenitoras humanas *in vivo*.

No obstante, aunque se observó un mejor equilibrio entre los linajes mielóide y linfóide en la sangre, no se observaron efectos significativos de la humanización de TPO sobre los niveles generales de injerto en los tejidos linfoides periféricos (incluyendo el bazo, la sangre y el timo) (figura 13(g)-(i)). Esto podría explicarse por diferentes factores. En primer lugar, aunque se irradia a niveles subletales a los ratones receptores antes del trasplante, todavía hay presente una gran población de células mieloides de ratón. Entre esas células, los macrófagos son capaces de fagocitar células humanas y limitar los niveles generales de injerto en la periferia. De este modo, el agotamiento genético de los macrófagos de ratón, o su inactivación funcional, podría permitir niveles más altos de injerto periférico. En segundo lugar, las células humanas pueden requerir factores de crecimiento humanos adicionales para favorecer su diferenciación terminal, la salida de la médula ósea y/o su supervivencia en la periferia. Se puede considerar un panel diverso de citocinas para cada linaje. Por último, aunque los órganos linfoides secundarios se forman en ratones humanizados, su estructura no es óptima en comparación con los tejidos humanos. Esta estructura parcialmente defectuosa podría representar un límite en el número de células humanas que pueden sobrevivir en estos órganos.

Se pueden usar sustituciones de genes adicionales para mejorar aún más los ratones receptores. Para conseguir esto, la tecnología usada en este estudio, basada en la sustitución de activación de un gen de ratón por su homólogo humano, presenta dos ventajas principales en comparación con los enfoques transgénicos clásicos. En primer lugar, ya que mantiene la mayor parte de las secuencias reguladoras de origen murino, garantiza que el gen humanizado se exprese fielmente en el ratón hospedador. En segundo lugar, como la estrategia de activación sustituye la citocina de ratón por su homólogo humano, puede afectar a la población o poblaciones de células de origen murino que dependen de esta citocina, en el caso de que la citocina humana no tenga reacción cruzada completa en el receptor de ratón. Esto puede proporcionar una ventaja competitiva adicional a la población o poblaciones de células humanas después

del trasplante. De hecho, este parece ser el caso para la TPO humana, ya que la sustitución homocigota de TPO conduce a una reducción de las plaquetas de ratón y las CMH en animales no injertados (figuras 13(a), 15(a) y 15(b)).

Con ratones con activación de TPO humana, se proporciona un modelo mejorado que puede ser útil para estudiar la fisiología *in vivo* de la hematopoyesis humana en general y en células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas en particular. Además, estos ratones sostienen *in vivo* neoplasias malignas hematopoyéticas humanas que se originan a partir de células hematopoyéticas tempranas, tales como, por ejemplo, leucemias mieloides y neoplasias mieloproliferativas.

5 Ejemplos

Los siguientes ejemplos no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Salvo que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en la escala de Celsius y la presión es la atmosférica o próxima a esta.

15 EJEMPLO 1

Obtención de ratones con IL-3/GM-CSF humano y TPO humana

20 Direccionamiento de hIL-3/GM-CSF. Una construcción de direccionamiento para la sustitución de un gen de IL-3 de ratón por un gen de IL-3 humana y un gen de GM-CSF de ratón por un gen de GM-CSF humano en una sola etapa de direccionamiento se construyó utilizando la tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 6.586.251 y Valenzuela *et al.* (2003) "High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis," *Nat Biot* 21(6):652-659; usando clonación de reparación de huecos.

25 Las secuencias de ratón se obtuvieron a partir del cromosoma artificial bacteriano (BAC) RPCI-23, clon 5E15. Las secuencias humanas se obtuvieron de la biblioteca Caltech D (CTD), BAC clon 2333J5.

30 Un vector donante de reparación de huecos que contenía un origen de replicación p15 se construyó clonando un brazo de homología de ratón 5' inmediatamente cadena arriba del mL-3 ATG, brazo de homología de IL-3 5' que se extiende desde la hIL-3 ATG hasta aproximadamente 274 nucleótidos dentro del gen de hIL-3, un polienlazador, un 3' hGM-CSF que comienza aproximadamente 2,9 kb cadena abajo de la secuencia de poliA del gen de hGM-CSF (aproximadamente 233 bases), y un casete de selección de fármaco loxed seguido de un brazo de homología 3' de ratón que tiene una secuencia cadena abajo (aproximadamente 2,9 kb cadena abajo) de la secuencia de poliA de mGM-CSF. El vector de reparación de huecos se linealizó y se insertó en la cepa DH10B de *E. coli* que contiene el clon 2333J5 CTD BAC humano y un vector enzimático de recombinación, como se describe en Valenzuela *et al.*

35 Las células se cultivaron en medio de selección de fármacos. Los clones individuales se cultivaron, se extrajo el ADN del vector donante de reparación de huecos y las partes del vector se secuenciaron para detectar las uniones ratón-humano adecuadas. Se usó electroforesis en gel de campo pulsado para establecer el tamaño del inserto y la longitud prevista del fragmento de restricción.

40 El donante capturado que contiene las cajas de homología cadena arriba y cadena abajo de ratón que flanquean el gen de hIL-3, el gen de hGM-CSF y el casete de selección de fármacos loxed se obtuvo a partir del vector de reparación donante, el donante capturado se linealizó y el donante capturado linealizado se introdujo en *E. coli* DH10B que contenía RPCI23 clon 5E15 y el vector pABG. Las células se cultivaron en medio de selección de fármacos. Los clones individuales que contenían el ADN donante capturado en el ADN 5E15 del clon RPCI23 (para formar el vector de direccionamiento) se aislaron, se extrajo el ADN del vector de direccionamiento y las partes del vector se secuenciaron para determinar las uniones ratón-humano adecuadas. Se usó electroforesis en gel de campo pulsado para establecer el tamaño del inserto y la longitud prevista del fragmento de restricción.

45 **Electroporación.** El vector de direccionamiento se linealizó y se usó para electroporar las células ME de ratón como se describe en Valenzuela *et al.* Las células ME de ratón sometidas a electroporación que contenían el vector de direccionamiento se sometieron a electroporación adicional con un vector que expresa Cre de forma transitoria para retirar el casete de selección de fármacos loxed. El vector de direccionamiento se sometió a electroporación en células ME Rag2 HET Il2rg y/-. La línea parental de células ME en la que se realizó la inactivación del gen RAG2 y el gen Il2rg era una célula ME V17 disponible en el mercado (BALB/c x 129 heterocigoto). Se usaron células ME específicas con los genes hIL-3 y hGM-CSF para introducir en embriones de ratón.

50 **Ratones hIL-3/GM-CSF.** Las células ME donantes dirigidas se introducen en embrión de ratón en estadio de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 7.294.754 y Poueymirou *et al.* (2007) "F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses", *Nat Biot* 25(1):91-99; VELOCIMICE® (los ratones F0 derivaron completamente de la célula ME donante) portador de IL-3 y GM-CSF humanizados, las construcciones se identifican mediante genotipado de la pérdida del alelo de ratón y la ganancia del alelo humano usando una modificación del ensayo de alelos (véase, por ejemplo, Valenzuela *et al.*). Estos ratones se crían primero con BALB/cAnNCR y después, los ratones

heterocigóticos para Rag2 e Il2rg más la IL-3/GM-CSF KI se crían con ratones con doble inactivación Rag2/Il2rg para estudios de injertos.

Fenotipado de ratones hIL-3/GM-CSF. Los ratones humanizados se analizaron para determinar la producción de GM-CSF humano mediante RT-PCR usando cebadores específicos de hGM-CSF. El patrón de expresión del GM-CSF humano para los tejidos analizados coincidió con el del GM-CSF de ratón (principalmente la expresión en el pulmón). Se realizaron ELISA de esplenocitos estimulados con ConA e IL-2 durante 48 horas de los ratones para detectar la presencia de hIL-3 y hGM-CSF; los esplenocitos fueron positivos para la expresión tanto de hIL-3 como de hGM-CSF.

Direccionamiento de hTPO. Una construcción de direccionamiento (figura 11 (d)) para sustituir el gen *Tpo* de ratón (mTpo) por el gen de *TPO* (hTPO) humano en una sola etapa de direccionamiento se construyó usando la tecnología VELOCIGENE® empleando clonación de reparación de hueco (Valenzuela y *col.*). El vector fue diseñado para sustituir la secuencia que abarca el marco de lectura abierto de *Tpo*, pero para mantener el promotor y la 5'UTR de origen murino. Las secuencias de ratón se obtuvieron a partir del cromosoma artificial bacteriano (BAC) RPCI-23, clon 98H7. Las secuencias humanas se obtuvieron de BAC RPCI-11, clon 63m3. Un vector donante de reparación de huecos que contenía un origen de replicación p15 se construyó clonando un brazo de homología de ratón 5' inmediatamente cadena arriba del m *Tpo* ATG, brazo de homología de *TPO* 5' que se extiende desde la h *TPO* ATG hasta aproximadamente 275 nucleótidos dentro del gen de *TPO*, un polienlazador, un brazo de homología 3' h *TPO* que comienza aproximadamente 1,5 kb cadena abajo de la secuencia de poliA del gen de h*TPO*, y un casete de selección de fármaco loxed seguido de un brazo de homología 3' de ratón que tiene una secuencia cadena abajo (aproximadamente 3,5 kb cadena abajo) de la secuencia de poliA de mTpo. El vector de reparación de huecos se linealizó y se insertó en la cepa DH10B de *E. coli* que contiene el clon BAC humano RPCI-11, 63m3 y un vector enzimático de recombinación, como se describe en Valenzuela y *col.* Las células se cultivaron en medio de selección de fármacos. Los clones individuales se cultivaron, se extrajo el ADN del vector donante de reparación de huecos y las partes del vector se secuenciaron para detectar las uniones ratón-humano adecuadas. Se usó electroforesis en gel de campo pulsado para establecer el tamaño del inserto y la longitud prevista del fragmento de restricción. El donante capturado que contiene las cajas de homología cadena arriba y cadena abajo de ratón que flanquean el gen de hTPO y el casete de selección de fármacos loxed se obtuvo a partir del vector de reparación donante, el donante capturado se linealizó y el donante capturado linealizado se introdujo en *E. coli* DH10B que contenía RPCI-23 clon 98H7 y el vector pABG. Las células se cultivaron en medio de selección de fármacos. Los clones individuales que contenían el ADN donante capturado en el ADN 98H7 del clon RPCI-23 (para formar el vector de direccionamiento) se aislaron, se extrajo el ADN del vector de direccionamiento y las partes del vector se secuenciaron para determinar las uniones ratón-humano adecuadas. Se usó electroforesis en gel de campo pulsado para establecer el tamaño del inserto y la longitud prevista del fragmento de restricción. El vector de direccionamiento se linealizó y se utilizó para electroporar las células madre embrionarias (ME) de ratón. El vector de direccionamiento se sometió a electroporación en células ME RAG2^{+/-} γc^{Y/-}. La línea de células ME parental RAG2^{+/-} γc^{Y/-} se fabricó a partir de una línea celular V17 ES disponible en el mercado (BALB/c x 129 heterocigoto). Las células ME correctamente dirigidas se sometieron a electroporación adicionalmente con un vector transitorio que expresa Cre para eliminar el casete de selección de fármacos loxed. Las células EM diana con el gen hTPO y sin casete de selección se introdujeron en un embrión de ratón en el estadio de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (Poueymirou y *col.*). Se obtuvieron ratones Rag2^{+/-}γc^{Y/-} con sustitución del gen de Tpo (TPO^{m/m}) de tipo silvestre, heterocigótico (TPO^{h/m}) u homocigótico (TPO^{h/h}) TPO.

EJEMPLO 2

ratones hIL-3/GM-CSF: Injerto

Aislamiento de células madre hematopoyéticas humanas. Las muestras de sangre de cordón umbilical y de hígado fetal humanos se obtuvieron con la aprobación del Comité de Investigación Humana de la Universidad de Yale, Hospital de Yale-New Haven y Facultad de Medicina Albert Einstein, Nueva York, respectivamente. Las células CD34⁺ se aislaron de sangre de cordón umbilical humano o de hígado fetal humano mediante centrifugación en gradiente de densidad y selección inmunomagnética usando microperlas CD34 (Miltenyi Biotec). La pureza de las células positivas para CD34 aisladas se verificó mediante citometría de flujo. Las células positivas para CD34 aisladas humanas purificadas se crioconservaron y se almacenaron en nitrógeno líquido antes de su uso.

Injerto de ratones con células madre hematopoyéticas humanas. El injerto se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Traggiai y *col.* (2004) Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice, *Science* 304:104-107). En resumen, el día de nacimiento de las crías en la situación de inactivación del gen RAG2/inactivación del gen Il2rg (con o sin hIL-3/hGM-CSF) se las irradió a niveles subletales (2 x 200 cGy con un intervalo de 4 horas). Después de la irradiación, las crías neonatas recibieron 1-2 x 10⁵ células CD34⁺ humanas resuspendidas en 25 microlitros de PBS) mediante inyección intrahepática usando una aguja de calibre 30. A los controles solo se les inyectó PBS. Los ratones fueron destetados a las 3-4 semanas de edad y se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos. Los ratones recibieron antibióticos profilácticos (Sulfatrim) en el agua para beber, para prevenir las infecciones oportunistas. Todos los trabajos con animales fueron aprobados por el Comité Institucionales de Uso y Cuidado de animales de la Universidad de Yale (IACUC) y se llevaron a cabo de acuerdo con las regulaciones del IACUC.

Análisis de los ratones injertados. El injerto con células hematopoyéticas humanas se determinó 8-12 semanas después del trasplante. Las muestras de sangre se obtuvieron del seno retroorbital y se efectuó lisis de los glóbulos rojos de la sangre utilizando tampón de lisis ACK (Lonza). A continuación, las muestras se tiñeron con anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia contra CD45 de ratón, CD45 humano, CD3 humano, y CD14 humano (todos de BD Biosciences) y se analizaron por citometría de flujo en un FACSCalibur™ (BD Biosciences). Los ratones usados para los experimentos de infección tenían niveles de injerto en sangre de > 4 % células hCD45+ a menos que se indique lo contrario. Los ratones coincidentes, es decir, ratones injertados con el mismo lote de células CD34+, se utilizaron para experimentos. Salvo que se indique de otro modo, los experimentos se realizaron con ratones injertados con células CD34+ de HF.

Citometría de flujo. Para los estudios de hIL-3/GM-CSF, se prepararon suspensiones celulares a partir de pulmón, LBA, médula ósea, el timo, bazo y sangre de ratones de 10-14 semanas postrasplante. La lisis de los glóbulos rojos se realizó usando tampón de lisis ACK (Lonza). Las muestras se tiñeron con anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos (mAb) contra antígenos de superficie celular de ratón y de ser humano. Se usaron los mAb siguientes: (1) Anti-humanos: CD3 (UCHT1), CD4 (RPA-T4), CD8 (HIT8a), CD11c (B-ly6), CD14 (MoP9), CD19 (HIB19), CD33 (WM53), CD45 (HI30 y 2D1), CD56 (NCAM 16.2), CD66 (B1.1), CD116 (4H1), CD123 (9F5). (2) Anti-ratón: CD45 (30-F11), F4/80 (BM8). CD116, CD45 (30-F11), y F4/80 fueron de eBioscience. Todos los demás mAb eran de BD Biosciences. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur™ o LSRII™ (BD Bioscience).

Ensayo de UFC en metilcelulosa. Para los estudios de hIL-3/GM-CSF, las células de médula ósea CD34+ humanas de ratones injertados se purificaron mediante clasificación de células. Las células clasificadas ($1-1,5 \times 10^5$) se cultivaron en medio de metilcelulosa basado en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM, GIBCO) (Methocult™ H4100, StemCell Technologies) que se suplementó con 20 % de FBS, 1 % de BSA, L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 55 μ M y las siguientes citocinas humanas: factor de células madre (10 ng/ml), ligando de FLT3 (10 ng/ml), trombopoyetina (50 ng/ml), IL-3 (20 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), IL-11 (10 ng/ml), GM-CSF (50 ng/ml) y eritropoyetina (4 U/ml) (todas de R & D Systems). Las células se incubaron en placas de Petri de 60 mm a 37 °C/5 % de CO₂. El número de colonias se determinó mediante microscopía después de 12-14 días.

Respuesta inflamatoria a LPS. Los ratones recibieron dos inyecciones i.p. de LPS ultrapuro de *E. coli* 0111:B4 (Invivogen) separadas por 48 horas (35 y 17,5 μ g). Los sueros se recogieron 2-3 horas después de cada inyección. Las concentraciones séricas de IL-6 humana se determinaron mediante ELISA (R & D Systems). Se sacrificó a los ratones 72 horas después de la primera inyección de LPS, se recogió la sangre por punción cardíaca y se utilizó para la citometría de flujo.

Tinción intracelular de citocinas. Para los estudios de hIL-3/GM-CSF, los péptidos solapantes que cubren la proteína TB10.4 entera (Skjot y col. (2002) Epitope mapping of the immunodominant antigen TB10,4 and the two homologous proteins TB10,3 and TB12,9, which constitute a subfamily of the esat-6 gene family, *Infect. Immun.* 70:5446-5453) se sintetizaron en la W.M. Keck Facility of Yale University. Los esplenocitos de los ratones infectados con BCG (2×10^6 /pocillo) se incubaron con péptidos mixtos (cada péptido a 5 μ g/ml) en un volumen total de 200 μ l/pocillo en placas de microtitulación de fondo en U de 96 pocillos (Becton Dickinson) durante 5 horas a 37 °C/5 % de CO₂. Se usó medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con 10 % de FCS, 1 % de penicilina-estreptomina, 1% de L-glutamina, y 2-mercaptoetanol 55 μ M para el cultivo celular. La tinción intracelular de citocinas se realizó utilizando el kit Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante. Los siguientes mAb se utilizaron para la tinción intracelular (todos de Biosciences BD): IFN γ (B27) anti-humano e IFN γ (XMG1.2) anti-ratón. Como controles se usaron mAb del mismo isotipo.

Histología e inmunohistoquímica. Para los estudios de hIL-3/GM-CSF, los órganos se recogieron y se fijaron en 10 % de formalina tamponada neutra o fijador de cinc (BD Biosciences) para el análisis histológico. Se prepararon secciones de tejidos embebidos en parafina, se tiñeron con H & E o PAS, o se procesaron para determinar la inmunohistoquímica por los Yale Pathology Tissue Services. Para la inmunohistoquímica se utilizaron los siguientes mAb anti-humanos (todos de Dako): CD45 (2B11+PD7/26), CD3 (F7.2.38), CD68 (PG-M1). La puntuación de las secciones de tejido para la presencia de granulomas se realizó de una manera ciega.

Análisis estadístico. Para los estudios de hIL-3/GM-CSF, se usó la prueba de Mann-Whitney no paramétrica para determinar la significación estadística entre dos grupos ($\alpha = 0,05$). Para las comparaciones multigrupo, se aplicó un modelo ANOVA de una vía con pruebas *post hoc* usando la prueba de comparación múltiple de Tukey ($\alpha = 0,05$). Solo se muestran los valores P estadísticamente significativos ($P < 0,05$).

EJEMPLO 3

Ratones hIL-3/GM-CSF injertados: Infección

S. typhi ISP2825 (Galán J.E. & Curtiss, R. (1991) Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *S. typhimurium* among other *S.* serovars: *invA* mutants of *S. typhi* are deficient for entry into mammalian cells, *Infect. Immun.* 59(9): 2901-2908, un aislado clínico de un paciente que sufre fiebre tifoidea, se cultivó durante la noche en caldo LB. Al día siguiente, 40 microlitros del cultivo de células bacterianas se transfirieron a 2 ml de caldo LB fresco que contenía NaCl

0,3 M y se cultivaron durante ~3 horas a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una DO_{600} de ~0,9. El cultivo bacteriano se centrifugó, se resuspendió en solución salina tamponada, y se usó para infecciones. En ratones humanizados de nueve a doce semanas de edad y control el día 0 por vía intraperitoneal se inocularon 1×10^3 o 1×10^4 o 1×10^5 de *S. typhi*. Los ratones infectados se vigilaron estrechamente y se sacrificaron a las 4 semanas después de la infección. El bazo, el hígado y la vesícula biliar se extirparon asépticamente y se homogeneizaron mecánicamente en 3-5 ml de PBS estéril que contiene desoxicolato de sodio al 0,05 %. El homogeneizado de tejido se diluyó en serie, se sembró en placas de agar LB y se incubó durante la noche a 37 °C para el recuento de colonias. Se contaron las colonias y se calculó el número total de unidades formadoras de colonias recuperadas. Los datos del ratón se proporcionan en las figuras 8-11. En la figura 8, los ratones "de control" se modificaron genéticamente sin injertar (RAG KO, Il2rg KO/hIL-3, hGM-CSF). En las figuras 9-11, los ratones "de control" son ratones no injertados con un gen RAG KO y un gen Il2rg KO (es decir, carecen de humanización de IL-3 y GM-CSF, pero en su lugar tienen IL-3 de ratón endógena y GM-CSF de ratón endógeno). En los ratones "de control" se inyectaron PBS en lugar de las células CD34+ humanas.

Como se muestra en la figura 8, la infección por *S. typhi* en el bazo se detecta en los dos ratones modificados genéticamente (RAG KO, Il2rg KO/hIL-3, hGM-CSF) a los 10 días de la infección.

Como se muestra en la figura 9, una semana después de la infección con 1×10^3 *S. typhi*, los ratones modificados genéticamente (RAG KO, Il2rg KO) con un porcentaje de injertos de 3,8 y 3 mostraron infección en el bazo ($p < 0,01$), aproximadamente un millar de veces más alto que los ratones de control. El valor p de la diferencia entre el control y el humanizado fue $p < 0,01$.

Como se muestra en la figura 10, los ratones modificados genéticamente (RAG KO, Il2rg KO) injertados con células positivas para CD34 de hígado fetal e infectados con 1×10^4 *S. typhi*, cuatro semanas después de la infección mostraron infección por *S. typhi* tanto en el bazo (un promedio de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 10.000 veces) como en el hígado (un promedio de aproximadamente 1.000 veces). Los ratones individuales en la cohorte de ensayo para *S. typhi* en bazo tenían (de arriba a abajo en la cohorte "humanizados" en el panel izquierdo de la figura 10) un porcentaje de injerto de las células humanas de 23,5, 40,1, 16,5, 50, 26 y 51,7. Los ratones individuales en la cohorte de ensayo para *S. typhi* en hígado tenían (de arriba a abajo en la cohorte "humanizados" en el panel derecho de la figura 10) un porcentaje de injerto de las células humanas de 16,5, 40,1, 23,5, 26, 50 y 51,7. El valor p de la diferencia entre el control y el humanizado en el bazo fue $p < 0,01$; en el hígado $p < 0,03$.

Como se muestra en la figura 11, los ratones modificados genéticamente (RAG KO, Il2rg KO) injertados con células positivas para CD34 de hígado fetal e infectados con 1×10^4 *S. typhi*, cuatro semanas después de la infección mostraron infección por *S. typhi* tanto en la vesícula biliar, con una ufc de *S. typhi*, en promedio, un millón de veces mayor que el ratón de control. Los ratones individuales en la cohorte de ensayo para *S. typhi* en vesícula biliar tenían (de arriba a abajo en la cohorte "humanizados" en la figura 10) un porcentaje de injerto de las células humanas de 23,5, 16,5, 40,1, 50, 26 y 51,7. El valor p de la diferencia entre el control y el humanizado fue $p < 0,03$.

Los resultados establecen que los ratones modificados genéticamente (RAG KO, Il2rg KO/hIL-3, hGM-CSF) pueden ser colonizados por *S. typhi* después de la infección sistémica.

EJEMPLO 4

Ratones hIL-3/GM-CSF injertados:

Validación del modelo de ratón para las respuestas inflamatorias humanas a patógenos pulmonares

Los genes que codifican GM-CSF (Csf2) e IL-3 están unidos estrechamente (<10 kb) en los cromosomas 5 y 11 en los seres humanos y ratones, respectivamente. Esto permitió la sustitución del ratón con los loci humanos para ambos genes para generar ratones hIL-3/GM-CSF KI (figura 5 (e)). Mientras que el alelo Il3 KI humano está bajo el control de elementos reguladores de ratón, el alelo Csf2 KI humano permanece bajo el control de sus elementos reguladores humanos. La expresión de ARNm de GM-CSF de ratón y humano se analizó mediante RT-PCR en ratones hIL-3/GM-CSF KI que expresan un alelo de cada gen de ratón y un alelo de cada gen humano, denominados ratones con IL-3/GM-CSF "humanos /de ratón" (h/m). Los ratones de tipo silvestre que solo tienen los alelos de ratón de IL-3 y GM-CSF se denominan ratones IL-3/GM-CSF "de ratón/ratón" (m/m).

Análisis mediante RT-PCR y ELISA de ratones hIL-3/GM-CSF KI. El ARN total se extrajo de tejidos homogeneizados con reactivo TRIzol™ (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Se usaron cantidades iguales de ARN tratado con ADNasa para la síntesis de ADNc con el sistema SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen). Se realizó RT-PCR convencional con los siguientes cebadores: (1) Csf2 de ratón: directo, CCAGTCCAAA AATGAGGAAG C (SEQ ID NO:7); inverso, CAGCGTTTTT AGAGGGCTAT (SEQ ID NO:8). (2) Csf2 humano: directo, GGCGTCTCCT GAACCTGAGT (SEQ ID NO:9); inverso, GGGGATGACA AGCAGAAAGT (SEQ ID NO:10). (3) Rpl13 de ratón: directo, GTACGCTGTG AAGGCATCAA (SEQ ID NO:11); inverso, ATCCCATCCA ACACCTTGAG (SEQ ID NO:12). La RT-PCR cuantitativa se realizó en un sistema de PCR en tiempo real 7500 con conjuntos de cebador-sonda adquiridos de ABI. Los valores de expresión se calcularon utilizando el método de ciclo umbral comparativo y se normalizaron con respecto a HPRT de ratón o de ser humano. Las proteínas IL-3 y GM-CSF

de ratón y de ser humano se detectaron con kits de ELISA específicos de especie de R & D Systems según las instrucciones del fabricante. Los esplenocitos se activaron con 5 µg/ml de concanavalina A (ConA) y 100 U/ml de IL-2 y los sobrenadantes se recogieron mediante ELISA después de 48 horas de estimulación.

5 **Expresión en ratones hIL-3/GM-CSF KI.** El ARNm de GM-CSF humano se expresó en un patrón similar a su homólogo de ratón con expresión más elevada en el pulmón (figura 5 (a)). La IL-3 se expresa principalmente en los linfocitos T activados que también producen GM-CSF. Por lo tanto, el ELISA se realizó en sobrenadantes de esplenocitos activados aislados de ratones h/m; se pudo detectar proteína de IL-3 y GM-CSF humana (figura 6 (f), 6(g)). Para conferir una ventaja competitiva a las células hematopoyéticas humanas, se generaron ratones KI homocigóticos que expresaban dos alelos de IL-3 y GM-CSF humanos, denominados ratones IL-3/GM-CSF "humano/humano" (h/h). El análisis por RT-PCR convencional y cuantitativa del tejido pulmonar mostró que los ratones h/h expresan solamente ARNm de GM-CSF humano pero no de ratón (figura 5 (b), 5(c)). La proteína GM-CSF humana se pudo detectar mediante ELISA en el fluido de lavado broncoalveolar (LBA) de ratones h/h (figura 5 (d)). Los resultados muestran que los ratones hIL-3/GM-CSF KI expresan fielmente GM-CSF humano (e IL-3).

15 La figura 5 (a)-(d) muestra la validación de la expresión de GM-CSF humano en ratones hIL-3/GM-CSF KI no injertados. La figura 5 (a) muestra el análisis representativo por RT-PCR de la expresión de ARNm de GM-CSF en diversos tejidos de ratones KI con un alelo de *Csf2* de ser humano y un alelo de ratón (h/m). Li, hígado; Br, cerebro; Lu, pulmón; Mu, músculo; Sp, bazo; Th, timo; LN, ganglio linfático; BM, médula ósea. Parte inferior, la especificidad de los cebadores para la detección de GM-CSF humano se verificó mediante análisis RT-PCR de tejidos de ratones control (m/m). La proteína ribosómica L13 (Rpl13) sirvió como control endógeno. La figura 5 (b) muestra el análisis por RT-PCR de la expresión de ARNm de GM-CSF en pulmones de ratones m/m o ratones KI homocigóticos que expresan dos alelos de *Csf2* humano (h/h) (cada uno *n* = 5). Rpl13 sirvió como control endógeno; NTC, control sin modelo. La figura 5 (c) muestra el RT-PCR cuantitativo de la expresión de ARNm de GM-CSF como en (b); la expresión de GM-CSF se normalizó con respecto a *Hprt* de ratón (cada uno *n* = 5). La figura 5 (d) muestra el ELISA de la proteína GM-CSF humana en el fluido del LBA recuperado de ratones m/m o h/h KI (cada uno *n* = 6); los resultados son representativos de dos experimentos independientes; cada punto representa un ratón; las barras horizontales indican los valores medios.

30 La figura 5(e) muestra una estrategia para generar ratones hIL-3/GM-CSF KI; la organización genómica de ratón (parte superior) y de *Il3* humana (parte inferior) y los loci de *Csf2* se muestran en los cromosomas 11 y 5, respectivamente. Los loci de ratón fueron sustituidos por loci humanos, como se describe en esta divulgación.

35 La figura 6(f),(g) muestra la expresión de IL-3 y GM-CSF humanos en ratones hIL-3/GM-CSF KI no injertados. Los resultados de ELISA para la producción de IL-3 (f) y GM-CSF (g) de ratón y humanos por esplenocitos activados se presentan. Los esplenocitos de los ratones m/m (barras abiertas) o h/m KI (barras rellenas) se estimularon con ConA e IL-2 durante 48 horas y los sobrenadantes se recogieron (cada uno *n* = 1). La IL-3 y el GM-CSF humanos no fueron detectables (ND) en ratones m/m.

40 EJEMPLO 5

Ratones hIL-3/GM-CSF injertados:

45 respuestas inflamatorias humanas mejoradas

Los ratones hIL-3/GM-CSF KI se generaron a partir de células madre embrionarias (ME) con un alelo de ambos *Rag2* y *Il2rg* ya eliminado. Se criaron en *Rag2* KO *Il2rg* KO, después se permitió el injerto con células hematopoyéticas CD34+ humanas. El quimerismo de las células hematopoyéticas CD45+ humanas y la distribución de linfocitos T, B y citolíticos naturales (NK) en la médula ósea, el timo, el bazo y la sangre no aumentó significativamente en los ratones hIL-3/GM-CSF KI (datos no mostrados). Además, las frecuencias de las células mieloides CD33+ humanas totales, los granulocitos CD66+, los monocitos/macrófagos CD14+, los monocitos no clásicos CD14loCD16+, las células dendríticas (CD) CD11c+ y CD CD123+CD11c-plasmocitoide no se incrementaron significativamente en ratones hIL-3/GM-CSF KI (datos no mostrados). Esto se aplica a ratones tanto h/m como h/h en condiciones de equilibrio. Por último, las células de médula ósea humana de ratones hIL-3/GM-CSF KI injertados tenían una capacidad similar para formar colonias mieloides en metilcelulosa *in vitro* (datos no mostrados). Estos resultados son consistentes con los resultados de estudios en ratones inactivados que muestran que tanto la IL-3 como el GM-CSF son en gran parte prescindibles para la mielopoyesis en equilibrio en los órganos analizados en el presente documento.

60 Por el contrario, el GM-CSF desempeña un papel importante en la mediación de las respuestas inflamatorias. La expresión de GM-CSF es inducida por estímulos inflamatorios, lo que conduce a la producción de citocinas inflamatorias (tales como IL-6 y TNFα) por los monocitos/macrófagos y a su reclutamiento a sitios de inflamación. Los monocitos CD14+ humanos procedentes de ratones hIL-3/GM-CSF KI injertados tenían la expresión más elevada de la cadena α del receptor de GM-CSF (CD116) (figura 8(d)). Por lo tanto, el análisis de ratones hIL-3/GM-CSF KI injertados se centró en los monocitos/macrófagos humanos. En primer lugar, se analizó la respuesta inflamatoria de los monocitos humanos en ratones hIL-3/GM-CSF KI injertados. La inflamación sistémica se indujo mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de lipopolisacárido (LPS). La frecuencia de monocitos CD14+ humanos en circulación aumentó

significativamente en ratones h/m en comparación con los ratones control m/m después de la inyección de LPS (figura 8 (e),(f)). La movilización potenciada de los monocitos humanos en ratones h/m se asoció con un aumento de las concentraciones séricas de la IL-6 humana después de una y dos inyecciones de LPS (figura 8 (g)). La producción inducida por LPS de TNF α humano también se incrementó en ratones h/m, pero este resultado no alcanzó significación estadística. Estos datos indican que los ratones hIL-3/GM-CSF KI injertados con células hematopoyéticas humanas tienen respuestas inflamatorias mejoradas mediadas por las células mielo-monocíticas humanas.

La figura 8 (d)-(g) ilustra la mejora en las respuestas inflamatorias humanas en ratones hIL-3/GM-CSF KI injertados. La figura 8(d) muestra el análisis por citometría de flujo de células de médula ósea humana de ratones hIL-3/GM-CSF h/m KI injertados en equilibrio; la gráfica de puntos (izquierda) está acotada en las células hCD45+mCD45. El histograma (derecha) muestra la expresión del receptor α (CD116) de GM-CSF sobre las células CD14 (población 1), granulocitos CD14mid/SSChi (población 2) y monocitos CD14hi (población 3). Se muestra un ejemplo representativo de un total de 12 ratones analizados. La figura 8(e) contienen un análisis por citometría de flujo representativo de células sanguíneas humanas de ratones m/m o h/m KI injertados con SC 72 horas después de dos inyecciones i.p. de LPS. Los gráficos están acotados en las células hCD45+mCD45. Los números próximos a las áreas en los recuadros indican los porcentajes de células CD14+ humanas. La figura 8(f) ilustra la frecuencia de células sanguíneas CD14+ humanas en ratones m/m ($n = 4$) o h/m injertados ($n = 8$) 72 horas después de las inyecciones de LPS. La figura 8(g) muestra los resultados del ELISA para la IL-6 humana en sueros de ratones m/m ($n = 4-5$) o h/m KI ($n = 8$) injertados 2-3 horas después de la primera (parte superior) y la segunda (parte inferior) inyección de LPS. Un ratón m/m murió después de la primera inyección de LPS. Cada punto representa un ratón. Las barras horizontales indican los valores medios. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

EJEMPLO 6

Ratones hIL-3/GM-CSF injertados:

injerto potenciado de macrófagos humanos en el pulmón

Análisis del LBA. Los análisis del líquido broncoalveolar para los estudios de hIL-3/GM-CSF se llevaron a cabo de la siguiente manera. Los pulmones fueron inflados con 1 ml de PBS a través de un catéter insertado en la tráquea. Esto se repitió dos veces y el lavado recuperado se agrupó. Tras la centrifugación, los sobrenadantes libres de células se guardaron para la determinación de la concentración de la proteína GM-CSF mediante ELISA o para el contenido de proteínas totales con el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce) según las instrucciones del fabricante. Después de la lisis de los glóbulos rojos (RBC) con tampón de lisis ACK (Lonza), los sedimentos de células se contaron se usaron para citometría de flujo o para las preparaciones de citoespin. Las células se centrifugaron sobre portaobjetos y se tiñeron con el kit de tinción Diff-Quik™ (Dade Behring) según las instrucciones del fabricante.

Injerto potenciado de macrófagos. La ausencia de GM-CSF de ratón conduce a un deterioro de los macrófagos alveolares de ratón (MA), lo que debería favorecer la reconstitución con macrófagos humanos en ratones hIL-3/GM-CSF KI homocigóticos. En apoyo de esto, el GM-CSF humano se expresa altamente en el pulmón y el LBA de ratones h/h, mientras que carece de GM-CSF de ratón.

Los MA de ratón de ratones h/h no injertados aumentaron de tamaño y tenían el aspecto típico "espumoso" (figura 9 (f)) que se ha descrito para los MA de ratones GM-CSF KO. Los ratones GM-CSF KO desarrollan PAP debido a un defecto en el aclaramiento del tensioactivo por los MA que tienen un bloqueo en la diferenciación terminal. De manera similar a lo que se ha indicado para ratones GM-CSF KO, los ratones h/h no injertados desarrollaron características de PAP, tales como acumulación subpleural de los MA completa de material positivo para (PAS) ácido peryódico de Schiff (figura 9(g)). Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que los ratones h/h no injertados muestran una diferenciación alterada de los MA de ratón y desarrollan PAP, y, por lo tanto, son funcionalmente equivalentes a los ratones GM-CSF KO.

La figura 9(f),(g) muestra el desarrollo de PAP en ratones hIL-3/GM-CSF KI no injertados homocigóticos. La figura 9(f) muestra la tinción de Diff-Quick™ de las células de LBA de ratones m/m o h/h KI no injertados (400 aumentos); se muestra un ejemplo representativo de un total de seis ratones analizados por grupo. La figura 9(g) muestra la tinción de PAS de secciones de tejido pulmonar de ratones m/m o h/h KI no injertados (400 aumentos); se muestra un ejemplo representativo de un total de 12 ratones analizados por grupo.

A continuación, se examinó el compartimento pulmonar de ratones h/h después del injerto con células hematopoyéticas humanas. El análisis FACS mostró que los ratones h/h tenían considerablemente más células CD45+ en el LBA (figura 6(a),(b)). La RT-PCR cuantitativa del tejido pulmonar reveló que este aumento en las células humanas consistía principalmente en células que expresan ARNm para los marcadores mieloides humanos CD33, CD11b, CD11c y CD14 (figura 6 (c)). Adicionalmente, la expresión de ARNm de CD68 humano, un marcador de macrófagos maduros que se expresa principalmente intracelularmente, se incrementó marcadamente en ratones h/h injertados (figura 6 (d)). Este aumento en ratones h/h se asoció con una mayor expresión de dos factores de transcripción que se expresan en los MA, concretamente, PU.1 (SPI1) y el receptor y activado por el proliferador del peroxisoma (PPAR γ) (figura 6(d)). PU.1 es altamente expresado en los MA terminales diferenciados de una manera dependiente de GM-

CSF. De manera importante, la transducción de MA GM-CSF KO con PU.1 *in vitro* invierte su deterioro funcional. El PPAR γ también se expresa altamente en MA, de forma similar a los ratones GM-CSF KO, los ratones PPAR γ KO desarrollan PAP. La tinción inmunohistoquímica de secciones de pulmón reveló la presencia de numerosas células hCD68+ con una ubicación típica intraalveolar, coherente con los MA humanos, en ratones h/h injertados (figura 6 (e)). Por el contrario, se pudieron detectar muy pocos MA humanos en ratones de control m/m injertados. En resumen, los pulmones de las células hematopoyéticas CD34+ trasplantados en ratones h/h muestran un injerto de macrófagos humanos marcadamente mejorado.

La figura 6(a)-(e) muestra que los ratones hIL-3/GM-CSF KI homocigóticos tienen un injerto mejor de macrófagos humanos en el pulmón. La figura 6(a) muestra un análisis de citometría de flujo de células para LBA de ratones KI m/m y h/h KI injertados. Los números al lado de las zonas señaladas indican los porcentajes de células hematopoyéticas hCD45+ y mCD45+. Las células mCD45+hCD45+ tienen una alta autofluorescencia y constituyen MA de ratón F4/80+. La figura 6(b) proporciona los números de células hematopoyéticas humanas (hCD45+) en el LBA de ratones m/m y h/h KI injertados (los resultados se combinan con tres experimentos independientes (en total $n = 15$ por grupo)). La figura 6(c) muestra los resultados del análisis por RT-PCR cuantitativa de la expresión génica linfóide y mielóide humana en tejido pulmonar de ratones m/m y h/h KI injertados (cada uno $n = 4$). La expresión se normalizó con respecto al HPRT de ratón (*, $P < 0,05$). La figura 6(d) muestra el análisis por RT-PCR cuantitativa de la expresión génica de macrófagos en tejido pulmonar de ratones m/m y h/h KI injertados (cada uno $n = 4$). La expresión se normalizó con respecto al HPRT de ratón (*, $P < 0,05$). Cada punto representa un ratón. Las barras horizontales indican los valores medios. La figura 6(e) muestra la inmunohistoquímica de las secciones de tejido pulmonar teñidas para CD68 humano de ratones m/m y h/h KI injertados (100 aumentos (parte superior) y 200 aumentos (parte inferior)). Se muestra un ejemplo representativo de un total de 10 ratones analizados por grupo.

EJEMPLO 7

Ratones hIL-3/GM-CSF injertados:

PAP aliviada por células hematopoyéticas humanas

Se investigó si el injerto aumentado de los ratones h/h con macrófagos humanos conduce a una función inmunitaria humana mejor en el pulmón. En primer lugar, se investigó si los macrófagos humanos pueden rescatar el síndrome de PAP que se descubrió en los ratones h/h no injertados. Aunque tanto las células del epitelio alveolar de tipo II como los MA pueden responder a GM-CSF, la PAP se puede rescatar mediante trasplante de médula ósea. Esto indica que las células hematopoyéticas, específicamente los MA, son el tipo de célula principal que es capaz de invertir la PAP. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que los ratones h/h injertados con células hematopoyéticas humanas deben tener una PAP menos grave. Como cabía esperar, los ratones h/h no injertados mostraron acumulación intraalveolar de material positivo para PAS (figura 7 (a)), que es una característica de la PAP. Coherente con la hipótesis, los ratones h/h injertados presentaban una acumulación de proteína menos grave en el pulmón, con los pulmones de algunos ratones h/h asemejándose a los de los ratones m/m de control (no injertados o injertados) (figura 7 (a)). Además, los ratones h/h injertados tenían cantidades significativamente menores de proteína total en el fluido de LBA de ratones h/h no injertados (figura 7 (b)). Estos resultados indican que las células hematopoyéticas humanas injertadas (presumiblemente MA) son capaces de aliviar la PAP en ratones hIL-3/GM-CSF KI homocigóticos.

Las figuras 7(a)-(e) muestran que las células hematopoyéticas humanas alivian la PAP en ratones hIL-3/GM-CSF KI homocigóticos. La figura 7(a) muestra una tinción PAS de secciones de tejido pulmonar de ratones m/m o h/h KI no injertados o injertados. Se muestran las secciones de pulmón de dos ratones h/h KI injertados (400 aumentos). Se muestran ejemplos representativos de un total de 10-12 ratones analizados por grupo. La figura 7(b) muestra la cuantificación de proteínas totales en el fluido de LBA de ratones h/h KI no injertados (no) o injertados o ratones m/m de control ($n = 6$ por grupo). $P < 0,0001$ ANOVA de una sola vía). Los valores de P según lo determinado por la prueba de comparación múltiple de Tukey se indican con asteriscos (**, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

EJEMPLO 8

Ratones hIL-3/GM-CSF injertados:

una respuesta de IFN de tipo I humano más fuerte a la gripe A

Infección por gripe A. Se infectó a ratones (9-10 semanas de edad) con 2×10^4 unidades formadoras de placas del virus de la gripe A/PR8 (H1N1) por vía intranasal. La infección se realizó mediante aplicación intranasal de 50 μ l de la reserva de virus diluido en PBS (o un volumen igual de PBS como control) a ratones que habían sido profundamente anestesiados con Anafane™ (Ivesco). Los pulmones se recogieron 24 horas después de la infección para la extracción de ARN y el análisis por RT-PCR cuantitativa tal como se ha descrito anteriormente.

Además de su papel en la homeostasis de pulmón, los MA son esenciales para la defensa del hospedador en el pulmón. Numerosos estudios han demostrado que los ratones GM-CSF KO son más susceptibles a diversos patógenos en el pulmón. Para evaluar la respuesta funcional de MA humanos injertados a un patógeno pulmonar, los

ratones h/h injertados se infectaron con el virus de la gripe A/PR8 (H1N1) por vía intranasal. Los MA son los principales productores de interferones de tipo I (IFN) después de la infección con virus pulmonares y los MA son necesarios para una respuesta innata eficaz frente a la gripe A. La expresión del ARNm de hipoxantina fosforribosiltransferasa humana (HPRT) fue significativamente más alta en los pulmones de ratones h/h injertados en comparación con los ratones m/m de control (figura 8(a)), lo que indica un quimerismo mejor de células inmunitarias humanas. Los ratones m/m injertados no mostraron inducción significativa de la expresión de ARNm de IFN β humano después de la infección por la gripe A en comparación con ratones m/m injertados que habían recibido PBS por vía intranasal (figura 8(b)). Por el contrario, los ratones h/h injertados expresaron significativamente más ARNm de IFN β humano que los ratones h/h no infectados y los ratones m/m infectados (figura 8(b)). El aumento de expresión de ARNm de IFN β humano en ratones h/h en comparación con los ratones m/m era todavía significativo cuando se normalizó con respecto a la HPRT humana, es decir, con el número de células humanas en el pulmón (figura 8(c)). En conjunto, los ratones hIL-3/GM-CSF KI homocigóticos permiten un mejor quimerismo y función de los macrófagos humanos en el pulmón que conduce a una mejor inmunidad de la mucosa humana a la infección vírica.

Las figuras 8(a)-(g) muestran que los ratones hIL-3/GM-CSF KI homocigóticos producen una respuesta de IFN de tipo I humana más fuerte a la infección por la gripe A. Las figuras 8 (a)-(c) muestran el análisis por RT-PCR cuantitativa de la expresión génica en tejido pulmonar de ratones m/m y h/h KI 24 horas después de la infección intranasal con la gripe A (PR8) (cada uno $n = 8$). La aplicación intranasal de PBS se usó como control (PBS) (cada uno $n = 4$). La figura 8(a) muestra la expresión de Hprt humana normalizada respecto a Hprt de ratón. $P < 0,0001$ (ANOVA de una sola vía). La figura 8(b) muestra la expresión de IFN γ humano normalizado respecto a Hprt de ratón. $P = 0,0171$ (ANOVA de una sola vía). La figura 8(c) muestra la expresión de IFN γ humano normalizado respecto a Hprt humana. $P = 0,0032$ (ANOVA de una sola vía). Los valores de P según lo determinado por la prueba de comparación múltiple de Tukey se indican con asteriscos (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$). Cada punto representa un ratón. Las barras horizontales indican los valores medios. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

EJEMPLO 9

Ratones hIL-3/GM-CSF injertados:

granulomas con células humanas después de la infección por micobacterias

Se investigó el potencial de los ratones hIL-3/GM-CSF KI para soportar las respuestas inflamatorias humanas a un segundo patógeno con tropismo por el pulmón, en el que los macrófagos desempeñan un papel central en la respuesta inmunitaria específica de un patógeno. Se seleccionó la formación de granulomas después de la infección con micobacterias. El granuloma representa una respuesta inflamatoria local especializada que es el rasgo característico de la infección por micobacterias.

Es un ejemplo clásico de una respuesta DTH y su formación es dependiente de la interacción entre los linfocitos T activados y los macrófagos. Tanto la IL-3 como el GM-CSF son necesarios para las respuestas de DTH óptimas y, notablemente, los ratones GM-CSF KO no forman granulomas cuando están infectados con micobacterias.

Los ratones hIL-3/GM-CSF h/m KI injertados fueron infectados mediante inyección intravenosa con el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), una cepa atenuada de *M. bovis* que se usa como vacuna contra la tuberculosis en los seres humanos. Los ratones usados para los experimentos de infección con BCG tenían niveles injerto en sangre de $>20\%$ de células hCD45+, con $> 8\%$ de células hCD45+ siendo linfocitos T (hCD3+). Los ratones tenían 9-10 semanas de edad en el momento de la infección. Los ratones fueron infectados con 1×10^5 unidades formadoras de colonias de BCG (Statens Serum Institute Copenhagen) en un volumen de 0,1 ml mediante inyección en la vena caudal.

Dado que los linfocitos T son esenciales para la formación de granulomas, primero se investigó la respuesta humana de linfocitos T al BCG cuatro semanas después de la infección. La citometría de flujo demostró claramente la presencia de linfocitos T humanos en los pulmones de ratones tanto m/m como h/m injertados (figura 9(a)). De hecho, los linfocitos T eran el tipo de célula hematopoyética humana predominante en los pulmones infectados con BCG. En comparación con los ratones m/m de control, los ratones h/m infectados con BCG tenían una relación promedio mayor de linfocitos T CD8 a CD4 humanos en los pulmones, aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística (figura 9(b), 9(c)). No hubo diferencias en la proporción de linfocitos T hCD4/hCD8 del bazo entre los dos grupos de ratones.

A continuación, se analizó la expresión de dos citocinas derivadas de linfocitos T, concretamente IFN γ y TNF α , ambas cruciales para la respuesta inmunitaria protectora contra las micobacterias. Se investigó la producción de IFN γ específico de BCG mediante tinción intracelular de citocinas después de la reestimulación de los esplenocitos de ratones infectados con péptidos derivados del antígeno micobacteriano TB10.4 inmunodominante. Como cabía esperar, pudo detectarse una población de linfocitos T de ratón productores de IFN γ entre los esplenocitos de ratones BALB/c (figura 9(d)). Además, se descubrió una respuesta de linfocitos T humanos específica de BCG en una subpoblación de ratones h/m y m/m injertados (figura 9(d)). Por último, la mayoría de los ratones h/m y m/m injertados expresa ARNm de IFN γ y TNF α humanos en el pulmón después de la infección con BCG (figura 9(e)). Estos resultados muestran que una subpoblación de ratones injertados es capaz de producir una respuesta de linfocitos T humanos

específica de un patógeno al BCG, aunque esta respuesta no se potenció en ratones hIL-3/GM-CSF KI. De acuerdo con esto, la carga bacteriana no fue diferente entre los ratones h/m y m/m.

5 A continuación, se evaluó la formación de granulomas en el pulmón y el hígado mediante histología cuatro semanas después de la infección. Los ratones m/m no injertados (que carecen de linfocitos T) no desarrollaron granulomas (tabla 1), lo que es coherente con el requisito de linfocitos T para la formación de granulomas. De forma análoga, los ratones m/m injertados con células humanas no mostraron granulomas ni en los pulmones ni en el hígado (tabla 1). Por el contrario, la mayoría de los ratones h/m tenía lesiones pequeñas o granulomas en los pulmones (figura 10(a)) o el hígado o en ambos órganos (tabla 1). En general, los granulomas observados eran pequeños y tenían una
10 organización laxa más típica de los granulomas en ratones que en seres humanos. Sin embargo, los granulomas pulmonares en ratones hIL-3/GM-CSF KI contenían células hematopoyéticas humanas (hCD45+) como se demuestra mediante inmunohistoquímica (figura 10(b)). La mayoría de estas células eran linfocitos T humanos (hCD3+) con unos pocos macrófagos humanos localizados centralmente (hCD68+) (figura 10(b)). En resumen, los ratones hIL-3/GM-CSF KI injertados son capaces de desarrollar granulomas que contienen linfocitos T humanos y macrófagos humanos en respuesta a la infección por micobacterias, lo que no se ha notificado anteriormente en los ratones HIS. En la tabla 1 se enumeran las lesiones/granulomas que se encuentran en secciones de hígado y tejido pulmonar de ratones BALB/c, m/m no injertados (no), m/m injertados y hIL-3/GM-CSF h/m KI injertados cuatro semanas después de la infección con BCG.
15

Tabla 1
Granulomas en hIL-3/GM-CSF KI injertados infectados con BCG

Nº de ratón	IL-3/GM-CSF	Hígado	Pulmón
1	m/m (no)	Ninguna lesión	Ninguna lesión
2	m/m (no)	Ninguna lesión	Ninguna lesión
3	m/m (no)	Ninguna lesión	Ninguna lesión
4	m/m (no)	Lesiones pequeñas	Ninguna lesión
1	m/m	Ninguna lesión	Ninguna lesión
2	m/m	Ninguna lesión	Ninguna lesión
3	m/m	Ninguna lesión	Ninguna lesión
4	m/m	Ninguna lesión	Ninguna lesión
5	m/m	Ninguna lesión	Ninguna lesión
6	m/m	Ninguna lesión	Ninguna lesión
1	h/m	Ninguna lesión	Ninguna lesión
2	h/m	Lesión neutrofílica	Granulomas
3	h/m	Lesiones pequeñas	Ninguna lesión
4	h/m	Lesiones pequeñas	Ninguna lesión
5	h/m	Lesiones pequeñas	Ninguna lesión
6	h/m	Ninguna lesión	Granulomas
7	h/m	Granulomas	Ninguna lesión
1	BALB/c	Ninguna lesión	Ninguna lesión
2	BALB/c	Lesiones pequeñas	Ninguna lesión
3	BALB/c	Lesiones pequeñas	Ninguna lesión
4	BALB/c	Granulomas	Ninguna lesión

20 Las figuras 9(a)-(g) muestran la respuesta de linfocitos T humanos a BCG en ratones hIL-3/GM-CSF KI injertados. Las figuras 9 (a)-(c) muestran el análisis por citometría de flujo de células pulmonares de ratones m/m y h/m KI injertados cuatro semanas después de la infección con BCG. La figura 9(a) muestra la frecuencia de linfocitos T humanos (hCD45+ hCD3+) en el pulmón. Los números próximos a las áreas en los recuadros indican los porcentajes de células. La figura 9(b) muestra la distribución de los linfocitos T CD4 y CD8 humanos en el pulmón. Los gráficos de puntos están acotados en las células hCD45+hCD3+. Los números en los cuadrantes indican los porcentajes de células. La figura 9(c) muestra la relación entre los linfocitos T CD4 respecto a CD8 en pulmón (cada uno $n = 6$). Cada punto representa un ratón. Las barras horizontales indican los valores medios. La figura 9(d) muestra análisis por citometría de flujo de esplenocitos de ratones BALB/c, ratones m/m injertados y ratones h/m KI injertados cuatro semanas después de la infección con BCG. Se volvió a estimular a los esplenocitos *in vitro* con un grupo de péptidos solapantes que cubren la proteína TB10.4 como se describe en el presente documento. Las gráficas de puntos muestran las frecuencias de los linfocitos T CD4 IFN γ + (mCD4+) o linfocitos T IFN γ + (hCD3+) humanos (hCD3+), determinada por tinción intracelular de citocinas. La tinción con anticuerpos de isotipo equivalente se usó como control. La figura 9(e) muestra los resultados del análisis por RT-PCR cuantitativa de la expresión génica de IFN γ humano (izquierda) y TNF α (derecha) en tejido pulmonar de ratones BALB/c, ratones m/m (no) no injertados, ratones m/m injertados y ratones h/m KI injertados cuatro semanas después de la infección con BCG ($n = 4-7$ por grupo). Cada punto representa un ratón. Las barras horizontales indican los valores medios.
25
30
35

40 Las figuras 10(a),(b) muestran que los ratones hIL-3/GM-CSF KI injertados desarrollan granulomas que contienen células humanas después de la infección con BCG. La figura 10(a) muestra la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de secciones de tejido pulmonar de los ratones KI h/m injertados cuatro semanas después de la infección con BCG

(100 aumentos (izquierda) y 200 aumentos (derecha)). La figura 10(b) muestra la inmunohistoquímica de secciones de tejido de pulmón teñidas para CD45, CD3 o CD68 humanos de ratones h/m KI injertados cuatro semanas después de la infección con BCG (200 aumentos). Se muestra un ejemplo representativo de dos ratones con granulomas pulmonares.

5

EJEMPLO 10

Ratones hTPO: injerto y análisis

10 **Trasplante en ratones TPO.** Se injertaron en ratones receptores progenitores hematopoyéticos humanos como se describe en Traggiai *et al.* Las muestras de sangre de cordón se obtuvieron de neonatos a término completos sanos, con aprobación del comité de investigaciones con seres humanos (Department of Labor and Birth, Yale New Haven Hospital, New Haven, CT). Las muestras de hígado fetal se obtuvieron del depósito de tejido fetal humano en la Facultad de Medicina Albert Einstein, Bronx, NY; y de Advance Biosciences Resources, Inc., Alameda, CA.

15

Se cortaron muestras de hígado fetal en pequeños fragmentos, se trataron durante 45 minutos a 37 °C con colagenasa D (100 ng/ml, Roche) y se preparó una suspensión celular. Las células CD34+ se purificaron a partir de muestras de hígado fetal o de sangre de cordón mediante centrifugación en gradiente de densidad (medio de separación de linfocitos, MP Biomedicals) seguido de la selección inmunomagnética positiva usando microperlas de CD34 anti-humanas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Las células se congelaron en 10 % de DMSO que contenía FBS o se inyectaron directamente.

20

Las crías recién nacidas (dentro del primer día de vida) fueron irradiados a niveles subletales (irradiación de rayos X, 2 x 150 cGy 4 horas de diferencia) y se inyectaron de 100.000 a 200.000 células CD34+ en 20 microlitros de PBS en el hígado usando una aguja de calibre 22 (Hamilton Company, Reno, NV).

25

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo del Comité de Investigación en seres humanos de la Universidad de Yale y los protocolos del Comité Institucional de Uso y Cuidados de animales de Yale.

30 **Expresión de TPO.** Las concentraciones séricas de la proteína TPO de ratón y humana se midieron mediante ELISA específico de la especie (RayBiotech) siguiendo el protocolo del fabricante. Para medir la expresión del ARNm humano y de ratón que codifica TPO, los tejidos se aislaron de animales adultos y el ARN total se purificó utilizando TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico contaminante se eliminó mediante tratamiento con ADNasa I sin ARNasa (Roche) y el ARN se transcribió de forma inversa usando la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen) y cebadores de oligo-dT. Se usaron los siguientes cebadores para la amplificación por PCR: mTpo directo, CCACCACCCA TGGATCTC (SEQ ID NO:1); mTpo inverso, AAAGCAGAAC ATCTGGAGCA G (SEQ ID NO:2); hTPO directo, CAGGACTGAA AAGGGAATCA (SEQ ID NO:3); hTPO inverso, CGTTGGAAGG CCTTGAATTT (SEQ ID NO:4); mRpl13a directo, GTACGCTGTG AAGGCATCAA (SEQ ID NO:5); mRpl13a inverso, ATCCCATCCA ACACCTTGAG (SEQ ID NO:6).

40

Para determinar si la TPO humana se expresa fielmente en estos ratones, se extrajo el ARN total de diversos órganos de un ratón TPO^{h/m} y se observó un patrón de expresión similar para el ARNm tanto de ratón como humano que codifica la TPO mediante RT-PCR (figura 11(a)). A continuación, se comparó la expresión en tres tejidos o tipos de células que se sabe que expresan TPO (células del hígado, riñón y del estroma multipotenciales mesenquimatosas) de ratones TPO^{m/m}, TPO^{h/m} y TPO^{h/h}. Se detectó la expresión de *Tpo* de ratón en las muestras de ratones TPO^{m/m} y TPO^{h/m}, mientras que la TPO humana se expresaba en TPO^{h/m} y TPO^{h/h} (figura 11(b)). También se midieron las concentraciones de proteína TPO en el suero de los ratones diana. Se detectó TPO de ratón en animales TPO^{m/m} y TPO^{h/m} y TPO humana en TPO^{h/m} y TPO^{h/h} (figura 11(c)). Las concentraciones medidas para TPO humana fueron, aproximadamente, 10 veces menores que las de TPO de ratón. Sin embargo, esta diferencia es compatible con las concentraciones fisiológicas indicadas en seres humanos y ratones (figura 11(c)), y podría deberse a las diferencias específicas de la especie en las semividas de las citocinas.

50

La figura 11 (a) muestra el análisis por RT-PCR de la expresión de TPO (mTpo) de ratón y TPO de ser humano (hTPO) en diferentes tejidos de un ratón Rag2^{+/-}γc^{-/-} TPO^{h/m}; *Rpl13a* de ratón se usó como gen doméstico; (b) análisis por RT-PCR de la expresión de mTpo y hTPO en hígado, riñón y células estromales multipotenciales mesenquimatosas (CEM) de ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{m/m}, TPO^{h/m} y TPO^{h/h}; (c) concentraciones de proteínas TPO humanas y de ratón medidas mediante ELISA en suero de ratones TPO^{m/m}, TPO^{h/m} y TPO^{h/h} (en pg/ml, media ± S.D., n= 7-9). ND: no detectado; los intervalos normales indicados son de R&D Systems, kits de trombopoyetina Quantikine.

55

60 **Aislamiento de células estromales multipotenciales mesenquimatosas.** Para los estudios de TPO, se extrajeron el fémur y la tibia de los ratones y se lavaron las células de la médula ósea. Los huesos se cortaron en trozos pequeños y se digirieron con colagenasa P y D (10 μg/ml) durante 45 minutos a 37 °C. Las células óseas asociadas se recogieron por pipeteado repetido. Las células se cultivaron en presencia de medio para CEM con suplementos estimulantes (StemCell Technologies) durante 14 días. Las células del linaje hematopoyético se retiraron del cultivo mediante clasificación celular inmunomagnética (MACS, Miltenyi Biotec) usando los anticuerpos CD45 y Ter119. Las células no hematopoyéticas (CD45-Ter119-) se cultivaron durante 5 días más y el fenotipo de CEM (CD45-Ter119-Sca1+CD90+

65

se confirmó mediante FACS (Diminici y col. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells, The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy* 8:315-317).

5 **Análisis de poblaciones celulares hematopoyéticas en ratones TPO.** Se extrajo sangre de los ratones 8-12 semanas después del trasplante. Los glóbulos rojos se lisaron tres veces usando ACK (Lonza) y las células se tiñeron con los anticuerpos CD45 anti-ratón y CD45 anti-humano. Los animales en los que al menos el 1 % de las células CD45+ eran de origen humano, se usaron para el análisis adicional. Aproximadamente el 80 % de los ratones trasplantados alcanzó este umbral de injerto y no se observaron diferencias entre los grupos TPO^{m/m} y TPO^{h/h}.

10 Se sacrificó a los ratones a los 3-4 o 6-7 meses después del injerto. Las suspensiones monocelulares se prepararon a partir de la médula ósea (lavado de 2 fémures y 2 tibias), el bazo y el timo. Los glóbulos rojos se eliminaron mediante lisis con ACK y las células se tiñeron para el análisis de FACS usando los siguientes anticuerpos. Para el injerto hematopoyético general: CD45-eFluor450 anti-ratón (30-F11, eBioscience) y CD45-APC-Cy7 anti-humano (2D1). Para las células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas y linajes hematopoyéticos: CD14-PerCP (MoP9), CD19-APC (HIB19), CD33-APC (WM53), CD34-PE (AC136, Miltenyi Biotec), CD38-FITC (HIT2), CD41a-APC (HIP8) y CD66-FITC (B1.1) anti-humanos.

20 Para el análisis de las células progenitoras y madre de ratón, el cóctel anti-linaje contenía anticuerpos biotinilados contra CD3ε (145-2C11), CD11b (M1/70), CD11c (HL3), CD19 (1D3), Gr1 (RB6-8C5) y Ly-76 (Ter119). Las células se tiñeron posteriormente con estreptavidina-APC-Cy7, anti cKit-APC (2B8) y anti Sca1-PE-Cy7 (D7).

25 Todos los anticuerpos se obtuvieron en BD Biosciences, excepto cuando se especifique lo contrario. Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur™ o LSRII™ (BD Biosciences) y se analizaron utilizando el software FlowJo™.

Caracterización funcional de las células progenitoras y madre hematopoyéticas humanas en ratones TPO.

30 Las células de médula ósea de 3 a 7 ratones injertados se agruparon y las células CD34+ humanas se purificaron mediante agotamiento por MACS de las células CD45+ de ratón (Miltenyi Biotec) seguido por clasificación por FACS de células CD45+ CD34+ en un citómetro de flujo FACSAria™ (BD Biosciences).

35 Para evaluar la capacidad de formación de colonias de las células CD34+ humanas, el IMDM se suplementó con un 20 % de FCS, L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 55 μM (todos los reactivos de GIBCO) mezclado con Methocult™ H4100, 1 % de BSA (Stemcell Technologies) y se añadieron las siguientes citocinas humanas: SCF (10 ng/ml), FLT3I (10 ng/ml), TPO (50 ng/ml), IL-3 (20 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), IL-11 (10 ng/ml), GM-CSF (50 ng/ml), EPO (4 U/ml) (todos de R&D systems). Se sembraron de 100.000 a 150.000 células clasificadas en placas de Petri de 60 mm y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 12-14 días. El número de colonias a los 12-14 días se contó y se clasificó en linaje mielode específico por microscopía.

40 Para los experimentos de trasplante secundario, se inyectaron 100.000 células CD34+ purificadas a partir de receptores primarios de TPO^{m/m} o TPO^{h/h} en receptores secundarios Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{m/m} irradiados a niveles subletales (2 x 200 cGy), como se ha descrito anteriormente. Se sacrificó a estos ratones 8 semanas más tarde y el porcentaje de células CD45+ humanas en la médula ósea se determinó mediante FACS.

45 **Análisis estadístico de los datos de ratones TPO.** Los datos se compararon mediante la prueba t para datos no emparejados de dos colas. Cuando se compararon más de 2 muestras, se realizó una ANOVA de una vía, seguida de pruebas de Tukey *post hoc*. Las proporciones de ratones injertados en el experimento de trasplante secundario se compararon mediante la prueba Chi cuadrado de Pearson. Las diferencias se consideraron significativas cuando los valores de p fueron inferiores a 0,05.

50 **EJEMPLO 11**

Ratones hTPO injertados:

55 **niveles de injerto humano mejorados en la médula ósea de ratones receptores TPO^{h/h}**

60 **Fenotipado de médula ósea de ratones humanizados e injertados.** Las células aisladas de la médula ósea de ratones humanizados se analizaron por citometría de flujo y mostraron mejoras estadísticamente significativas en el injerto de las células hematopoyéticas humanas totales, células madre hematopoyéticas humanas, células mieloides humanas, y granulocitos humanos en relación con el injerto de ratones no humanizados (es decir, inactivados para RAG y Il2rg que carecen de humanización del gen TPO). Véanse las figuras 12 y 14.

65 Los ratones Rag2^{-/-} γ^{-/-} con sustitución del gen de *Tpo* (TPO^{m/m}) silvestre, heterocigótico (TPO^{h/m}) u homocigótico (TPO^{h/h}) TPO se prepararon como se ha descrito. Los ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-}TPO^{m/m} y TPO^{h/h} neonatos irradiados (2 x 1,5 Gy) se injertaron con células CD34+ humanas purificadas de sangre de cordón o de hígado fetal y se analizó el injerto en la médula ósea 3-4 meses o 6-7 meses más tarde.

La figura 12 muestra los resultados de estudios de injertos. La figura 12(a) muestra el análisis FACS representativo de células CD45⁺ humanas y de ratón en médula ósea de ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{h/m} y TPO^{h/h} de 3 a 4 meses después del injerto con células CD34⁺ humanas. Los resultados de dos ratones representativos se muestran para cada genotipo. Se indican los porcentajes de las células CD45⁺ de ratón y humanas entre las poblaciones de células CD45⁺ totales (ratón + ser humano). La figura 12 (b) muestra los porcentajes de células CD45⁺ humanas en la médula ósea de 3 a 4 meses (izquierda, *n* = 42-53) o de 6 a 7 meses (derecha, *n* = 20-25) después del trasplante. Cada símbolo representa un ratón individual, las barras horizontales indican los valores medios. La figura 12(c) muestra el número absoluto de células CD45⁺ humanas en la médula ósea de los mismos animales que en (b). Los valores *P* indican significación estadística.

Se observó un aumento significativo en los porcentajes (figura 12(a) y 12(b)) y número absoluto (figura 12(c)) de las células hematopoyéticas humanas (hCD45⁺) en la médula ósea de receptores TPO^{h/h} en comparación con TPO^{m/m} en ambos puntos temporales. Adicionalmente, los receptores TPO^{h/h} mostraron una variabilidad del injerto menor, con un quimerismo humano de al menos el 80 % en el 75 % de los ratones a los 3-4 meses (figura 12(b)). La fuente de las células CD34⁺ no afectó a este resultado, ya que un aumento similar en el quimerismo en los hospedadores TPO^{h/h} se observó con células derivadas de sangre de cordón umbilical y de hígado fetal (figura 12(d)). Curiosamente, aunque el número de células humanas disminuyó en los hospedadores TPO^{m/m} entre los puntos temporales iniciales y finales, se mantuvieron constantes en los animales TPO^{h/h} (figura 12(c)). Estos resultados son consistentes con las funciones descritas anteriormente de TPO en el ratón. En primer lugar, la TPO favorece la expansión de las CMH después del trasplante en ratones receptores irradiados, lo que lleva a un aumento de los niveles del injerto; en segundo lugar, favorece el mantenimiento de las CMH adultas, lo que lleva a una hematopoyesis sostenida durante la vida adulta.

EJEMPLO 12

Ratones hTPO injertados:

efecto de la humanización de TPO sobre plaquetas de ratón y humanas

Análisis de plaquetas en ratones TPO. Los recuentos de plaquetas en la sangre periférica se midieron usando una máquina Hemavet™ 950FS (Drew Scientific). Las muestras de sangre se tiñeron con CD61-PE anti-ratón (2C9.G2) y CD41a-APC anti-humano (HIP8) y los porcentajes de plaquetas de ratón y humanas se determinaron mediante citometría de flujo, sin necesidad de establecer ningún acotamiento en el tamaño (FSC) o la granulosidad (SSC) de las células. Los recuentos absolutos de plaquetas de ratón y humanas se calcularon multiplicando estos porcentajes respectivos con los recuentos absolutos de las plaquetas.

Como la TPO se conoce bien por su función crucial sobre la trombopoyesis, se investigó si la humanización de la TPO afectaba al desarrollo de las plaquetas. La humanización de ambos alelos del gen de TPO condujo a una reducción de aproximadamente dos veces en los recuentos de plaquetas en sangre de ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-} no injertados (figura 13 (a)). Después del injerto con células humanas, los recuentos de plaquetas de ratón en ratones TPO^{h/h} disminuyeron aún más, a menos del 25 % de los valores normales (figura 13(d)). La relación entre las plaquetas humanas y de ratón (figura 13(b), 13(c)), así como los recuentos absolutos de plaquetas humanas (figura 13(e)), tendieron a ser mayores en los ratones TPO^{h/h} que en los ratones TPO^{m/m}, pero ninguna de estas diferencias alcanzó significación estadística. Adicionalmente, el porcentaje de megacariocitos de la médula ósea (células CD41a⁺) entre las células humanas fue comparable en las dos cepas (figura 13(f)). Estos resultados demuestran que los niveles o la actividad biológica de la TPO humana alcanzados por la estrategia de activación no son suficientes para reemplazar totalmente la función de la TPO de ratón, y, además, sugieren que la TPO humana por sí sola no es suficiente para soportar la trombopoyesis humana en el entorno del ratón.

La figura 13(a) muestra el recuento de plaquetas en la sangre de ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-}TPO^{m/m}, TPO^{h/m} y TPO^{h/h} adultos no injertados, *p* < 0,0001 (ANOVA de una vía, *n* = 7-17; los valores *p* se indicados calcularon con la prueba post hoc de Tukey). Cada símbolo representa un ratón individual, las barras horizontales indican los valores medios; (b) análisis FACS representativo de plaquetas (mCD61⁺) de ratón y (hCD41a⁺) humanas en la sangre de ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{m/m} y TPO^{h/h} de 3 a 4 meses después del injerto. Los números indican porcentajes entre los acontecimientos totales; (c) quimerismo de plaquetas humanas, determinado por FACS, en ratones TPO^{m/m} y TPO^{h/h} (*n* = 19-22). Solo los ratones con un porcentaje de células CD45⁺ humanas en la sangre superior al 5 % se incluyeron en este análisis; (d),(e) recuento de plaquetas (mCD61⁺, (d)) de ratón (hCD41a⁺, (e)) y humanas en la sangre de receptores de TPO^{m/m} y TPO^{h/h}; (f) porcentajes de megacariocitos humanos (CD41a⁺) entre las células CD45⁺ humanas de la médula ósea.

Las figuras 13(g)-(i) muestran los niveles de injertos humanos en los órganos linfoides secundarios. Las figuras 13 (g),(h) proporcionan los porcentajes de células CD45⁺ humanas en sangre (20 g; *n* = 43-53) y en el bazo (13h; *n* = 35-36) de ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{m/m} y TPO^{h/h} (cada símbolo representa un ratón individual, las barras horizontales indican los valores medios); (i) muestra la celularidad total del timos de receptores de TPO^{m/m} y TPO^{h/h} injertados (*n* = 24-34). Más del 90 % de las células que se encontraron en el timo eran de origen humano (hCD45⁺).

EJEMPLO 13

Ratones hTPO injertados:**hematopoyesis de linaje múltiple en ratones humanizados con TPO**

- 5 **Fenotipado de células sanguíneas de ratones humanizados e injertados.** Las células aisladas de sangre de ratones humanizados se analizaron por citometría de flujo y mostraron mejoras estadísticamente significativas en el injerto de monocitos y granulocitos humanos en relación con el injerto de ratones no humanizados (es decir, inactivados para RAG y Il2rg que carecen de humanización del gen TPO). Véase la figura 14.
- 10 Se investigó si la TPO humana podría favorecer la diferenciación multilínea de las células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas *in vivo*. Como se ha indicado anteriormente (Traggiai *et al.*, Ishikawa *et al.* (2005) Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor gamma chain(null) mice, *Blood* 106:1565-1573), las células humanas injertadas dieron lugar principalmente a linfocitos B (CD19⁺) en hospedadores Rag2^{-/-}γc^{-/-} de tipo silvestre (61,51 ± 4,71 % de las células humanas en el bazo, media ± sem, n = 32),
- 15 con solo una pequeña fracción de las células mieloides. Cuando se compararon los receptores de TPO^{m/m} y TPO^{h/h}, se observó un aumento significativo de la frecuencia de las células mieloides CD33⁺ en la médula ósea de los ratones TPO^{h/h} (figura 14 (a) y 14 (b)). Curiosamente, este incremento se debió principalmente a los granulocitos (células CD33⁺CD66^{hi}SSC^{hi}), mientras que la fracción de monocitos (CD33^{hi}CD66^{lo}CD14⁺) fue similar en ambas cepas (figura 14(a),(c),(d),(e)). El porcentaje de células mieloides (tanto granulocitos como monocitos) también fue
- 20 significativamente mayor en la sangre periférica de los animales TPO^{h/h} (figura 14 (a),(f) y (g)).

Las figuras 14(a)-(g) representan la mejora de la hematopoyesis multilínea en ratones hTPO medida por las células CD33⁺, CD66⁺, CD14⁺ en ratones TPO^{m/m} y TPO^{h/h} injertados. La figura 14(a) muestra el análisis FACS representativo de poblaciones de células mieloides humanas en médula ósea y sangre de ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{m/m} y TPO^{h/h} de 3

25 a 4 meses después del injerto. Los números indican los porcentajes entre las poblaciones de células acotadas indicadas. Las figuras 14(b)-(e) muestran el análisis de las poblaciones de células mieloides humanas con respecto al quimerismo de las células CD45⁺ en la médula ósea de receptores Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{m/m} y TPO^{h/h} (n = 19). La figura 14(b) proporciona poblaciones mieloides totales (células CD33⁺). La figura 14(d) proporciona granulocitos (CD33⁺CD66^{hi}). La figura 14(c) muestra tinción DiffQuickTM de células hCD45⁺SSC^{hi}CD33⁺CD66^{hi} purificadas a partir de la médula ósea de receptores de TPO^{h/h}. La figura 14(e) muestra monocitos (CD33⁺CD66^{lo}CD14⁺). Cada símbolo representa un

30 ratón individual, las barras horizontales indican los valores medios. Las figuras 14(f) y (g) muestran el análisis de las poblaciones de células mieloides humanas con respecto al quimerismo de las células CD45⁺ en la sangre de receptores Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{m/m} y TPO^{h/h} (n = 6-7); Figura 14(f): granulocitos (CD66⁺); Figura 14(g): monocitos (CD14⁺).

EJEMPLO 14**Ratones hTPO injertados:****efecto de la humanización sobre células madre y progenitoras hematopoyéticas de ratón y humanas**

- 40 Se analizó el efecto de la TPO humana en el número y la función de las CMH y las propias células progenitoras. La eliminación genética de TPO conduce a una reducción de las CMH en ratones adultos. Para determinar si la humanización de TPO podría afectar a la población de ratones inmunofenotípicamente definida como que contiene CMH de ratón, se compararon los porcentajes de las células Sca1⁺ c-Kit⁺ de linaje negativo en la médula ósea de
- 45 ratones adultos TPO^{m/m}, TPO^{h/m} y TPO^{h/h} no injertados.

La figura 15 muestra una disminución de las células lin⁻c-Kit⁺Sca1⁺ de ratón y aumentó el número y el potencial de autorrenovación de las células madre y progenitoras humanas en la médula ósea de ratones con activación de TPO humana. La figura 15(a) muestra los resultados representativos de FACS de células madre y progenitoras Lin⁻ Sca1⁺ c-Kit⁺ de ratón en la médula ósea de ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{h/m} y TPO^{h/h} no injertados en comparación con ratones silvestres para TPO (TPO^{m/m}) Rag2^{-/-}γc^{-/-}. Los números indican el porcentaje de células Sca1⁺ c-Kit⁺ entre la población Lin⁻. La figura 15(b) muestra el análisis cuantitativo de los resultados presentados en (a), p = 0,0006 (ANOVA de una

50 vía; los valores p indicados se calcularon con la prueba post hoc de Tukey; n=5/por genotipo y los resultados presentados son representativos de 2 experimentos independientes). Cada símbolo representa un ratón individual, las barras horizontales indican los valores medios. La figura 15(c) muestra el análisis FACS representativo de células CD34⁺CD38⁻ humanas en la médula ósea de ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{m/m} y TPO^{h/h} de 3 a 4 meses después del injerto. Los números indican el porcentaje de células CD38⁻ entre las células CD45⁺CD34⁺ humanas. La figura 15(d) muestra el análisis cuantitativo de los porcentajes de las células CD38⁻ en la población de células CD45⁺CD34⁺ humanas en ratones receptores de TPO^{m/m} y TPO^{h/h} (n = 43-53). La figura 15(e) muestra el número absoluto de células CD34⁺CD38⁻

55 humanas en la médula ósea de los mismos animales que en 15(d). Las figuras 15(f) y (g) muestran el ensayo de formación de colonias en metilcelulosa con células CD45⁺CD34⁺ humanas purificadas de receptores de Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{m/m} y TPO^{h/h}. La figura 15(f) es UFC-GEMM, La figura 15(g) es UFB-E (negro), UFC-G (blanco), UFC-M (gris) y UFC-GM (línea de puntos). Las células CD34⁺ se agruparon a partir de grupos de 3-4 ratones, 4 grupos independientes por genotipo de ratones receptores. En la figura 15 (h), las células CD45⁺CD34⁺ humanas se purificaron a partir ratones

65 receptores primarios Rag2^{-/-}γc^{-/-} TPO^{m/m} y TPO^{h/h}, se trasplantaron en ratones neonatos Rag2^{-/-}γc^{-/-} (100.000 células por ratón), y el quimerismo de las células CD45⁺ humanas se determinó en los receptores secundarios 8 semanas

después. Los resultados se reunieron a partir de dos experimentos independientes ($n = 7-12$ receptores primarios, $n = 11-19$ receptores secundarios).

5 Se observó una reducción significativa en el porcentaje de estas células en ratones tanto TPO^{h/m} como TPO^{h/h} en comparación con TPO^{m/m} (figura 15(b)), lo que sugiere que la TPO humana no presenta reactividad cruzada completa en el receptor de ratón o no está disponible en cantidades suficientes para las células de ratón en este entorno de inactivación.

10 Las poblaciones de CD34⁺ humanas en la médula ósea de hospedadores TPO^{m/m} y TPO^{h/h} injertados se caracterizaron. Las CMH humanas con potencial de repoblación a largo plazo están contenidas en la fracción de células Lin-CD34⁺CD38⁻. El porcentaje de células CD34⁺ entre la población de células CD45⁺ humanas se incrementó ligeramente en ratones TPO^{h/h} (12,39±0,79 % frente a 10,00±0,81 %, media±sem, $n = 43-53$, $p = 0,037$). Se observó un incremento pequeño (1,5 veces), pero estadísticamente significativo en el porcentaje de células CD38⁻ dentro de la población CD34⁺ en TPO^{h/h} en comparación con los receptores TPO^{m/m} (figura 15 (c),(d)). En su conjunto, esto dio como resultado un incremento significativo (aproximadamente 2,8 veces) de los números absolutos de células CD34⁺CD38⁻ en ratones humanizados con TPO (figura 15(e)). De este modo, sobre la base del inmunofenotipo de la superficie celular, la TPO humana favorece a una población de células que se sabe que están altamente enriquecidas para CMH.

20 Para hacer frente a las propiedades funcionales de esta población celular, las células CD34⁺ humanas se purificaron a partir de la médula ósea de ratones TPO^{m/m} y TPO^{h/h} y se evaluaron en ensayos independientes de formación de colonias de metilcelulosa *in vitro*. UFC-GEMM son colonias mieloides de multilineaje derivadas de células inmaduras que al menos contienen todo el potencial de eritromegacariocitos y células mieloides. Se detectó la formación de UFC-GEMM, aunque en pequeñas cantidades, de las cuatro muestras de células CD34⁺ aisladas de ratones receptores TPO^{h/h}, mientras que solo una muestra de TPO^{m/m} generó UFC-GEMM (figura 15(f)). Este resultado demuestra un mejor mantenimiento de las células progenitoras hematopoyéticas humanas inmaduras en receptores TPO^{h/h}. Adicionalmente, en consonancia con la diferenciación mieloides mejorada observada *in vivo* (figura 14), el número de UFC-M también fue significativamente mayor en las muestras de células CD34⁺ humanas aisladas de ratones TPO^{h/h} en comparación con ratones TPO^{m/m} (225,0 ± 12,25 frente a 81,25 ± 10,80 colonias por 150.000 células CD34⁺ sembradas en placas, media±sem, $p = 0,0001$; Figura 15(g)).

35 El mantenimiento y/o la autorrenovación de las células CMH se demuestra mejor funcionalmente mediante trasplantes secundarios con éxito. Las células de repoblación SCID (CRS) que se injertan en serie en los ratones representan actualmente el la referencia experimental sustituta para la función de las CMH humanas. De este modo, las células CD34⁺ humanas se purificaron de la médula ósea de receptores primarios TPO^{m/m} y TPO^{h/h} y se trasplantaron en un número igualmente bajo (100.000 células CD34⁺ por animal) en ratones neonatos Rag2^{-/-}γc^{-/-}. La médula ósea de los receptores secundarios se analizó 8 semanas más tarde (figura 15(h)). Las células CD34⁺ humanas aisladas de receptores primarios TPO^{m/m} tenían una capacidad muy baja de injertarse en serie, dado que se detectaron células CD45⁺ humanas solo en 2 de 11 receptores secundarios. Por el contrario, las células CD45⁺ humanas estaban presentes en la médula ósea de 15 de 19 ratones injertados con células CD34⁺ aisladas de receptores primarios TPO^{h/h} ($p = 0,0012$). Dado que el genotipo de los ratones receptores secundarios era el mismo para ambos grupos (TPO^{m/m}), este resultado indica que la presencia de TPO humana en el receptor primario favorecía el mantenimiento de las células humanas con una mayor capacidad de autorrenovación.

45 En conjunto, estos resultados demuestran que los ratones homocigóticos humanizados con TPO representan un mejor entorno para mantener la capacidad de autorrenovación y el potencial de diferenciación multilineaje de las células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas.

50 Todos los ejemplos se proporcionan para ayudar al lector a comprender los principios y conceptos de la invención y se usan sin limitaciones a los ejemplos y realizaciones específicos descritos. El alcance de la presente invención no pretende limitarse a las realizaciones y ejemplos mostrados y descritos en esta divulgación.

Las siguientes cláusulas numeradas, que describen aspectos de la invención, son parte de la descripción.

55 1. Un ratón modificado genéticamente, que comprende:

- a. una inactivación del gen RAG de ratón;
- b. una inactivación del gen Il2rg de ratón;
- d. una sustitución de un gen de IL-3 de ratón con un gen de IL-3 humana, en la que el gen de IL-3 humana está en un locus del gen de la IL-3 de ratón; y,
- d una sustitución de un gen de GM-CSF de ratón con un gen de GM-CSF humano, en la que el gen de GM-CSF humano está en un locus del gen de la GM-CSF de ratón.

65 2. El ratón de la cláusula 1, que comprende además una sustitución de un gen de la trombopoyetina de ratón con un gen de la trombopoyetina humana, en el que el gen de la trombopoyetina humana está en un locus del gen de la trombopoyetina de ratón.

3. El ratón de la cláusula 1, en el que la inactivación del gen RAG se selecciona de una inactivación del gen RAG1, una inactivación del gen RAG2 y una combinación de las mismas.

4. El ratón de la cláusula 1, que comprende además un injerto de células hematopoyéticas humanas.

5. El ratón de la cláusula 4, en el que las células hematopoyéticas se seleccionan del grupo que consiste en células sanguíneas de cordón umbilical y células hepáticas fetales.

6. El ratón de la cláusula 5, en el que las células hematopoyéticas humanas son células sanguíneas de cordón umbilical humano que son células CD34+.

7. El ratón de la cláusula 3, en el que el ratón comprende una célula humana que es una célula positiva para CD34, una célula madre hematopoyética, células hematopoyéticas, una célula precursora mieloide, una célula mieloide, una célula dendrítica, un monocito, un granulocito, un neutrófilo, un mastocito o una combinación de los mismos.

8. El ratón de la cláusula 3, en el que el ratón comprende células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas, células progenitoras mieloides humanas, células mieloides humanas, células dendríticas humanas, monocitos humanos, granulocitos humanos, neutrófilos humanos, mastocitos humanos, timocitos humanos, linfocitos T humanos, linfocitos B humanos, Plaquetas humanas.

9. El ratón de la cláusula 4, que comprende una infección por *Salmonella typhi*.

10. El ratón de la cláusula 9, en el que la infección por *Salmonella typhi* es una infección sistémica por *Salmonella typhi*.

11. El ratón de la cláusula 4, que comprende una infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

12. El ratón de la cláusula 11, en el que el ratón comprende un granuloma de pulmón que comprende una célula inmunitaria humana.

13. Un método para identificar un agente que inhibe una infección por un patógeno humano, que comprende:

administrar un agente a un ratón infectado por un patógeno humano, injertado y modificado genéticamente, en el que el ratón comprende

- i. una inactivación del gen RAG1 o una inactivación del gen RAG2, o una combinación de las mismas,
- ii. una inactivación del gen Il2rg,
- iii. una sustitución de un gen de IL-3 de ratón por un gen de IL-3 humana, en la que el gen de IL-3 humana está en un locus del gen de la IL-3 de ratón, y,
- iv. una sustitución de un gen de GM-CSF de ratón por un gen de GM-CSF humano, en la que el gen de GM-CSF humano está en un locus del gen de la GM-CSF de ratón

en el que el ratón carece sustancialmente de células hematopoyéticas endógenas y se han injertado células de sangre de cordón umbilical humanas positivas para CD34 o células hepáticas fetales humanas positivas para CD34; y,

b. determinar si el agente reduce la cantidad del patógeno humano en el ratón infectado por el patógeno humano.

14. El método de la cláusula 13, en el que el ratón comprende además una sustitución de un gen de la trombopoyetina de ratón con un gen de la trombopoyetina humana.

15. El método de la cláusula 13, en el que el patógeno humano es *Salmonella typhi*.

16. El método de la cláusula 13, en el que el patógeno humano es una micobacteria y la micobacteria produce en el ratón un granuloma que comprende una célula inmunitaria humana.

17. El método de la cláusula 16, en el que la micobacteria es *Mycobacterium tuberculosis*.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
UNIVERSIDAD DE YALE
INSTITUTE FOR RESEARCH IN BIOMEDICINE (IRB)

<120> RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE E INJERTO

<130> EAH/FP7186919
 <140> EP
 <141> 04/10/2010
 5
 <150> EP10822486.6
 <151> 04/10/2010
 <150> PCT/US2010/051339
 10
 <151> 04/10/2010
 <150> US61/320.132
 <151> 01/04/2010
 15
 <150> US61/256.237
 <151> 29/10/2009
 <150> US61/249, 069
 <151> 06/10/2009
 20
 <160> 12
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
 25
 <210> 1
 <211> 18
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 1
 ccaccacca tggatctc 18
 35
 <210> 2
 <211> 21
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 2
 45
 aaagcagaac atctggagca g 21
 <210> 3
 <211> 20
 <212>ADN
 50
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 55
 <400> 3
 caggactgaa aagggaatca 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212>ADN
 60
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 65
 <400> 4

ES 2 700 852 T3

	cgttggaagg ccttgaatt	20
5	<210> 5 <211> 20 <212>ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 5 gtacgctgtg aaggcatcaa	20
15	<210> 6 <211> 20 <212>ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 6 atcccatcca acaccttgag	20
25	<210> 7 <211> 21 <212>ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador sintético	
35	<400> 7 ccagtccaaa aatgaggaag c	21
40	<210> 8 <211> 20 <212>ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 8 cagcgttttc agaggctat	20
50	<210> 9 <211> 20 <212>ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 9 ggcgtctcct gaacctgagt	20
60	<210> 10 <211> 20 <212>ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 10	

ES 2 700 852 T3

ggggatgaca agcagaaagt 20

5 <210> 11
<211> 20
<212>ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador sintético

15 <400> 11
gtacgctgtg aaggcatcaa 20

20 <210> 12
<211> 20
<212>ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador sintético

20 <400> 12
atcccatcca acaccttgag 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ratón Rag2^{-/-}IL-2ry^{-/-} modificado genéticamente, que comprende una sustitución de un gen de trombopoyetina (TPO) de ratón con un gen de TPO humana en un locus del gen de TPO de ratón, en donde el ratón comprende células hematopoyéticas humanas y el ratón está infectado por un patógeno humano que no infecta ratones de tipo silvestre.
2. El ratón de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ratón comprende una sustitución de cada alelo del gen de TPO de ratón con un gen de TPO humana.
- 10 3. El ratón de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la sustitución de un gen de IL-3 de ratón con un gen de IL-3 humana en un locus del gen de IL-3 de ratón.
4. El ratón de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 3, que comprende además una sustitución de un gen de GM-CSF de ratón con un gen de GM-CSF humano en un locus del gen de GM-CSF de ratón.
- 15 5. Un método de producción de un ratón que comprende células hematopoyéticas humanas e infectado con un patógeno humano, comprendiendo el método:
inyectar células hematopoyéticas humanas en un ratón Rag2^{-/-}IL-2ry^{-/-} modificado genéticamente, en donde el ratón modificado genéticamente comprende una sustitución de un gen de trombopoyetina (TPO) de ratón con un gen de TPO humana en un locus del gen de TPO de ratón; e infectar el ratón modificado genéticamente con un patógeno humano que no infecta ratones de tipo silvestre.
- 20 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el ratón comprende una sustitución de cada alelo del gen de TPO con un gen de TPO humana.
- 25 7. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que las células hematopoyéticas humanas comprenden células sanguíneas de cordón umbilical humano o células de hígado fetal humano.
- 30 8. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que las células hematopoyéticas humanas comprenden células CD34+ humanas.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además:
irradiar al ratón modificado genéticamente antes del injerto.
- 35 10. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el ratón modificado genéticamente comprende además una sustitución de un gen de IL-3 de ratón con un gen de IL-3 humana en un locus del gen de IL-3 de ratón.
- 40 11. El método de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 10, en el que el ratón comprende además una sustitución de un gen de GM-CSF de ratón con un gen de GM-CSF humano en un locus del gen de GM-CSF de ratón.

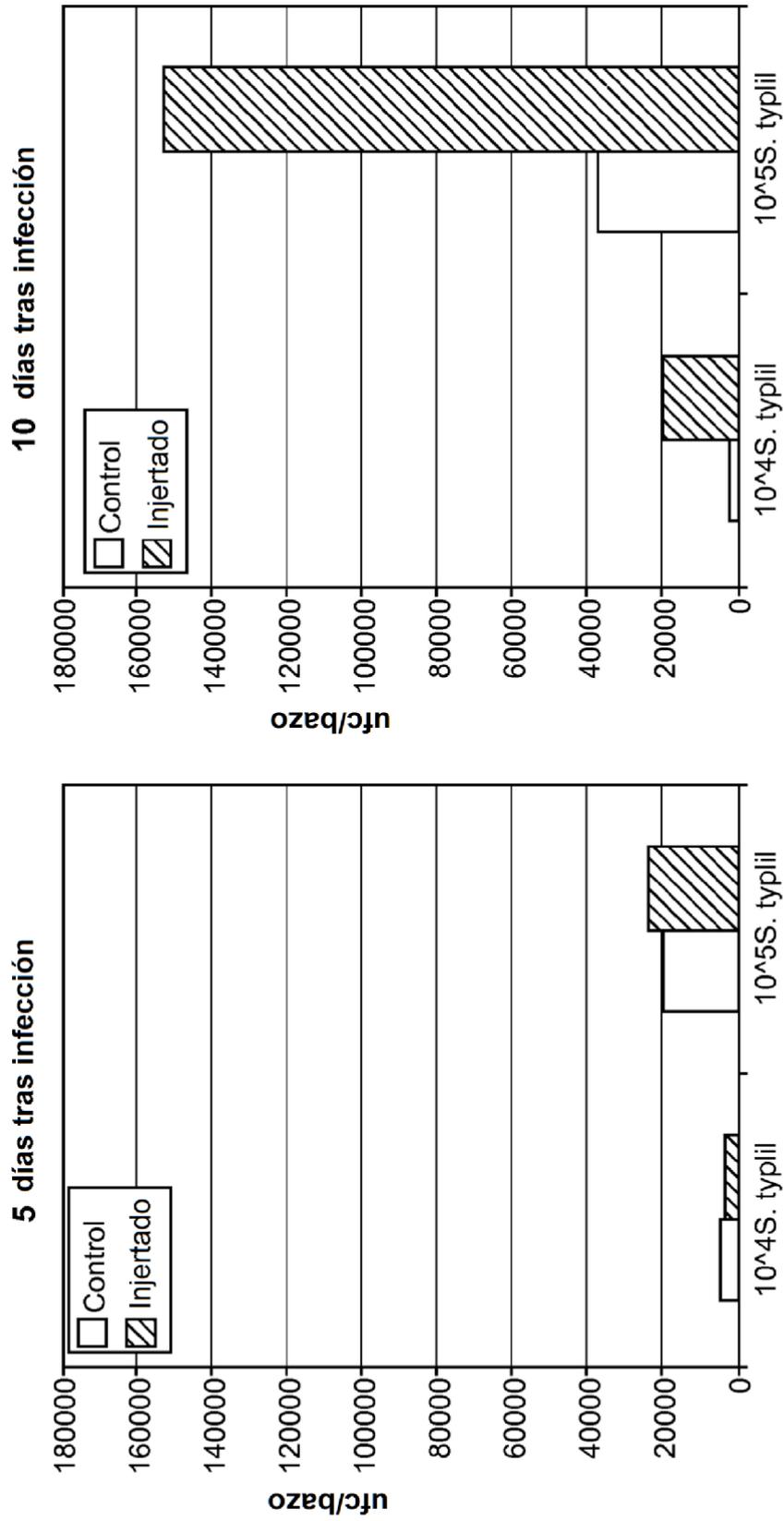


FIG. 1

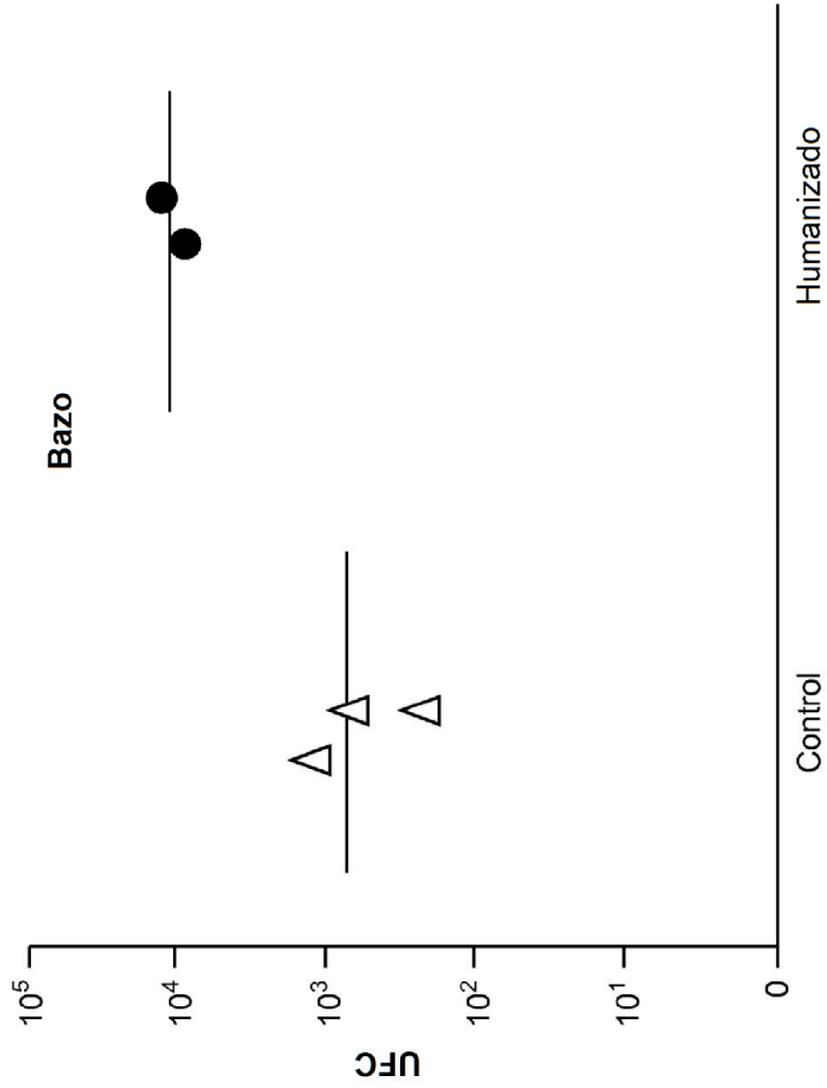


FIG. 2

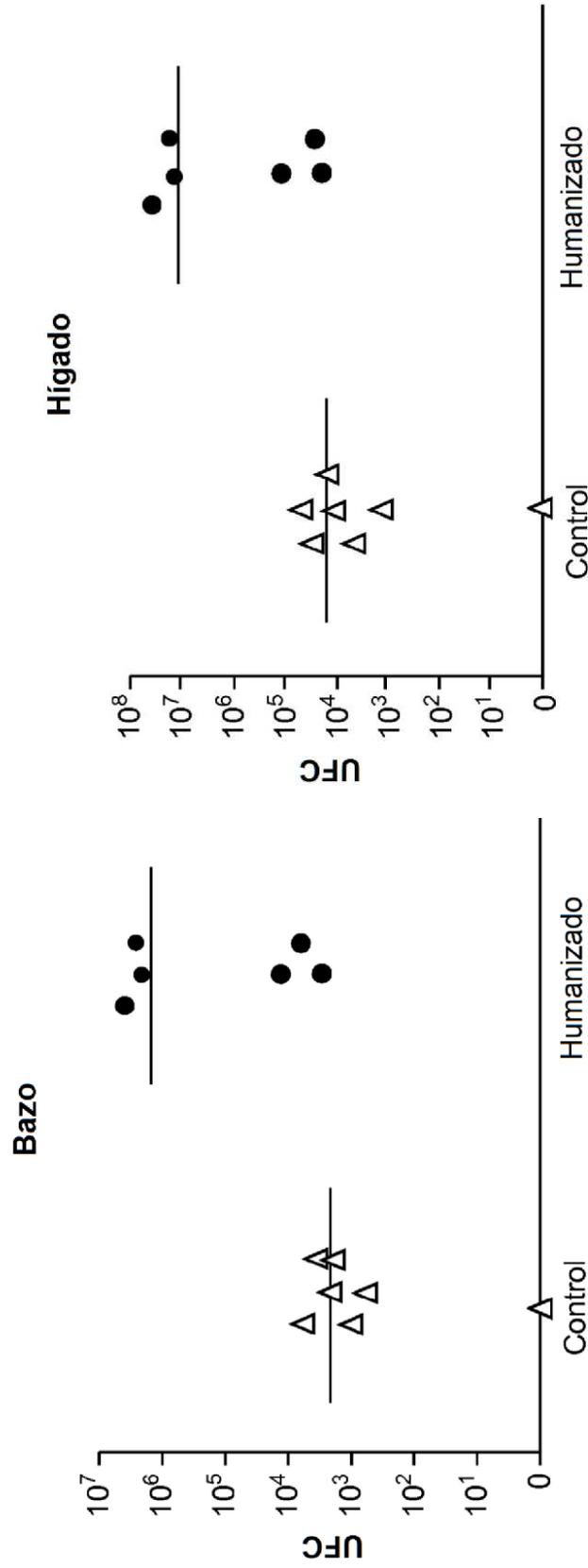


FIG. 3

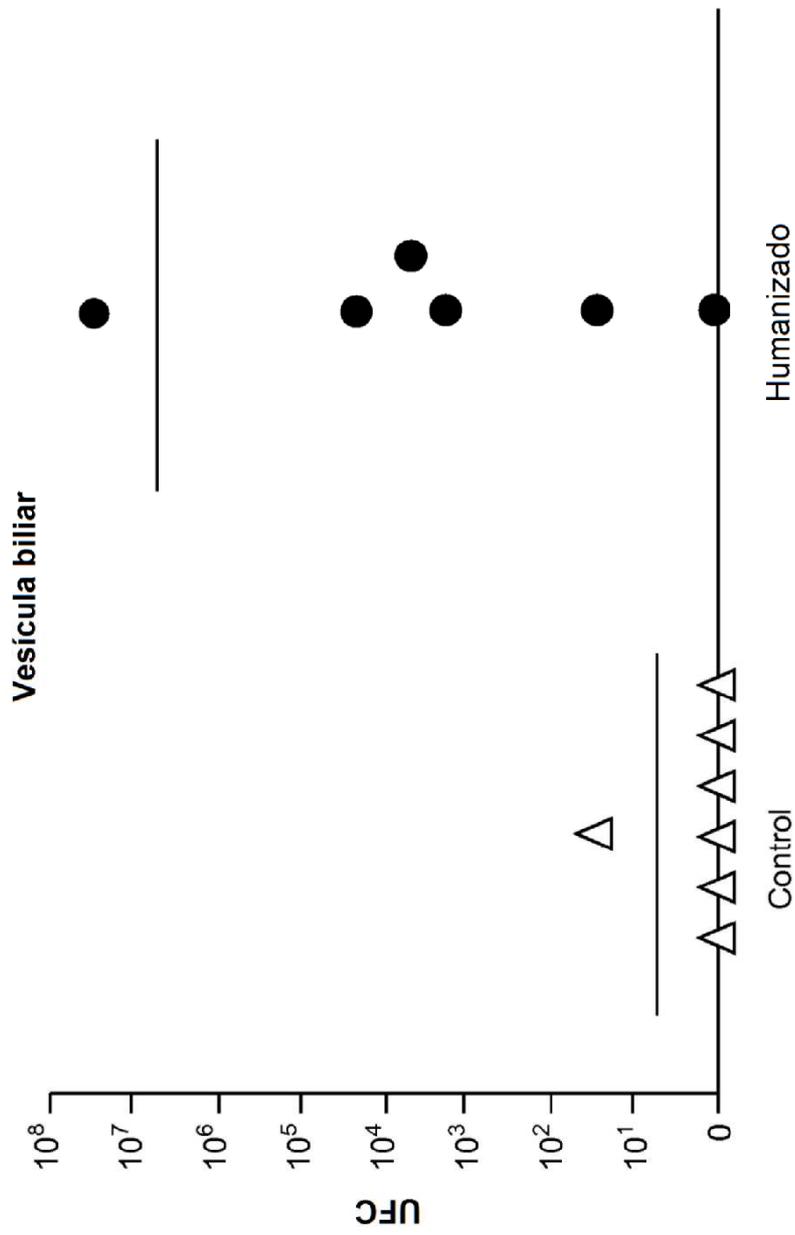


FIG. 4

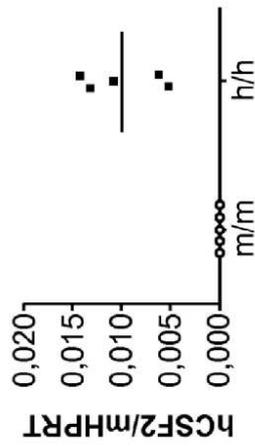
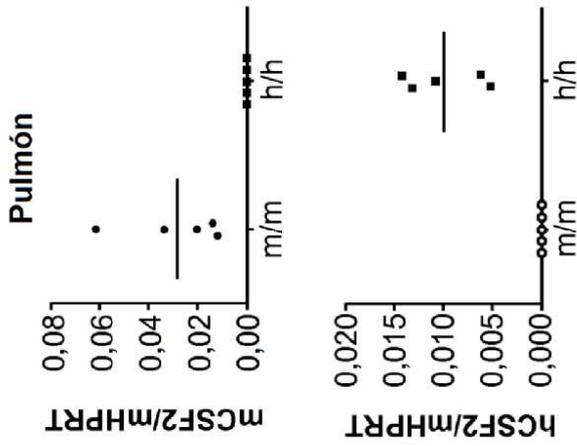


FIG. 5c

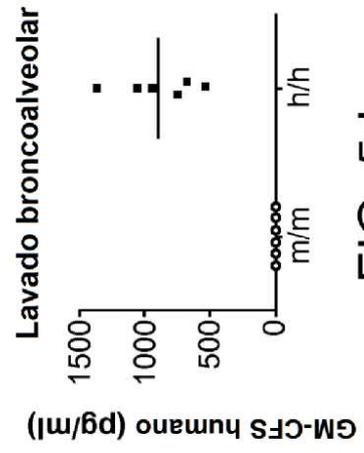


FIG. 5d

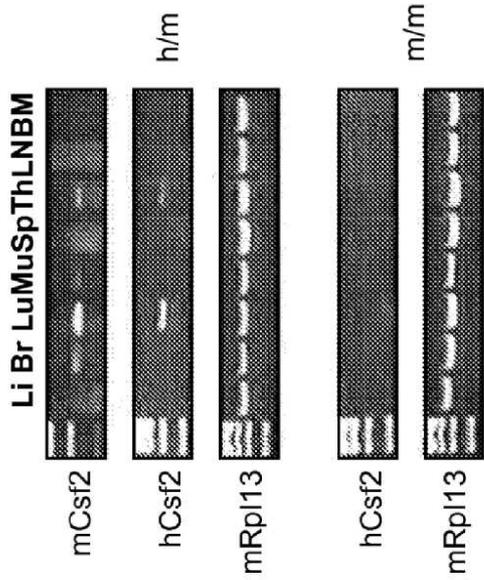


FIG. 5a

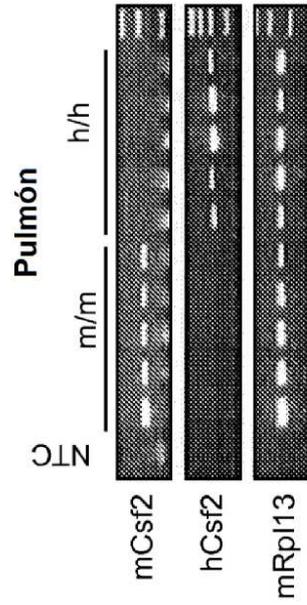


FIG. 5b

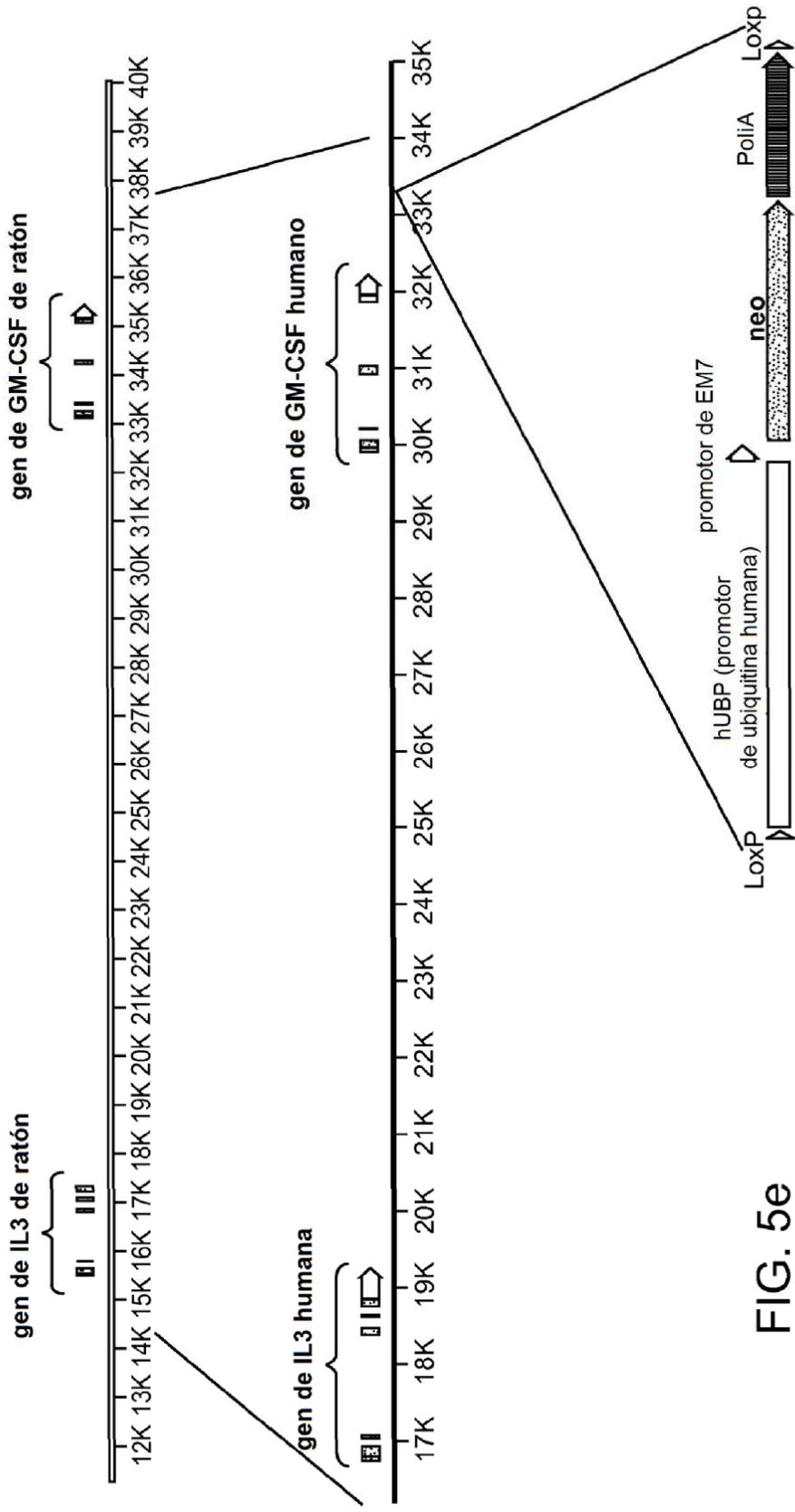


FIG. 5e

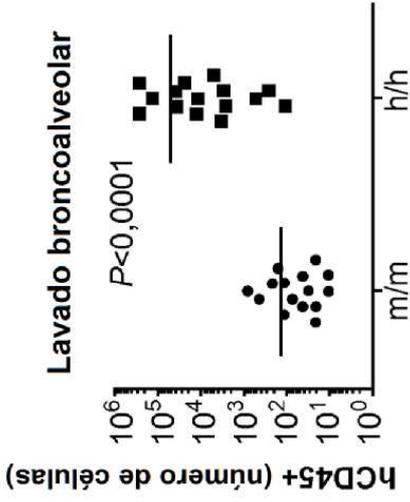
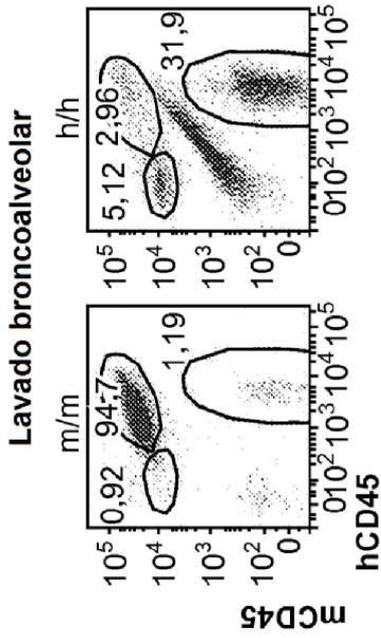


FIG. 6a

FIG. 6b

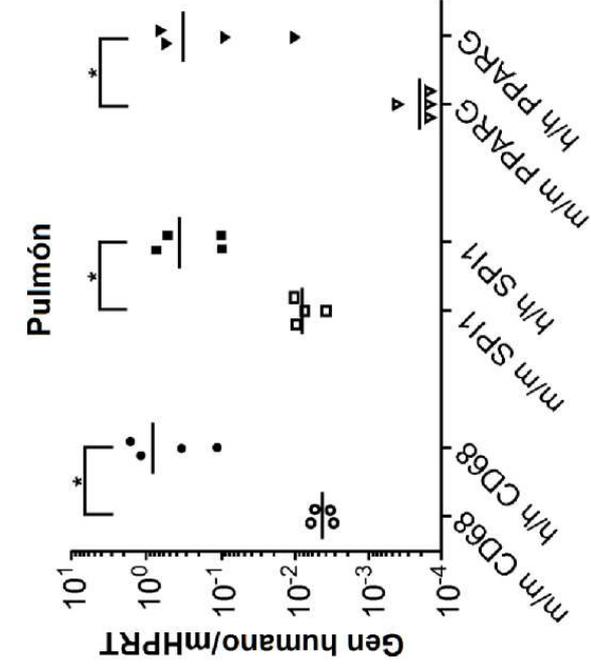
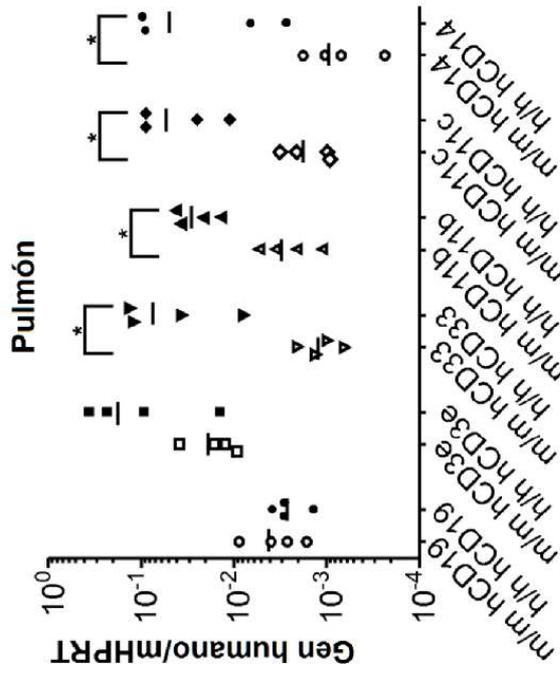


FIG. 6c

FIG. 6d

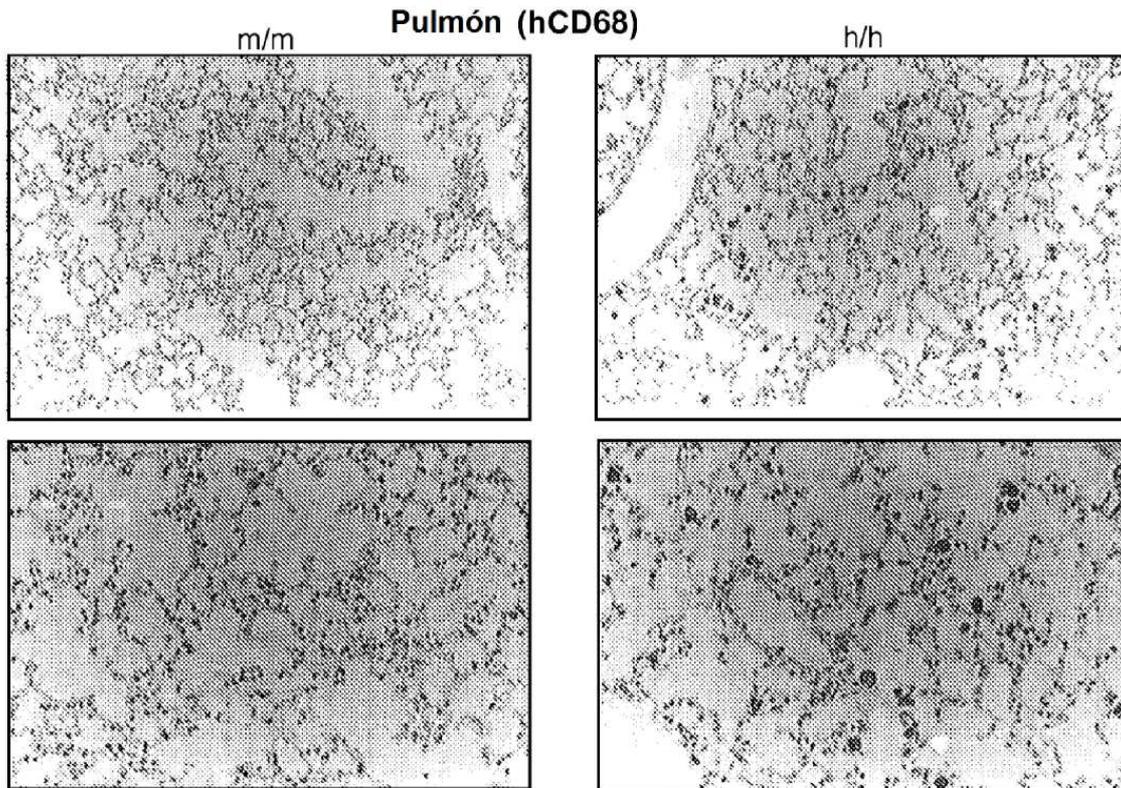


FIG. 6e

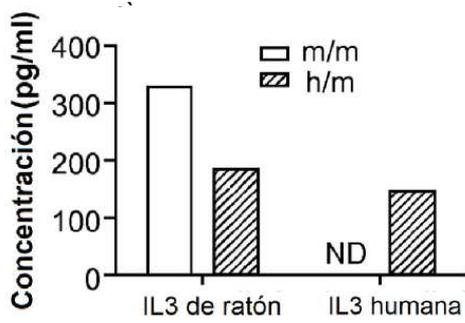


FIG. 6f

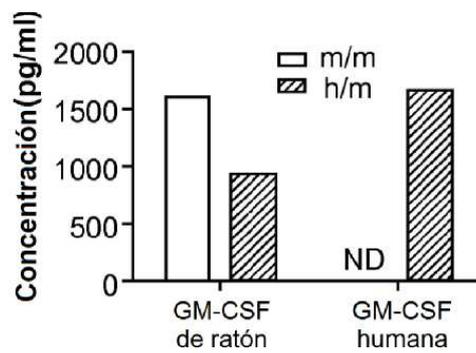


FIG. 6g

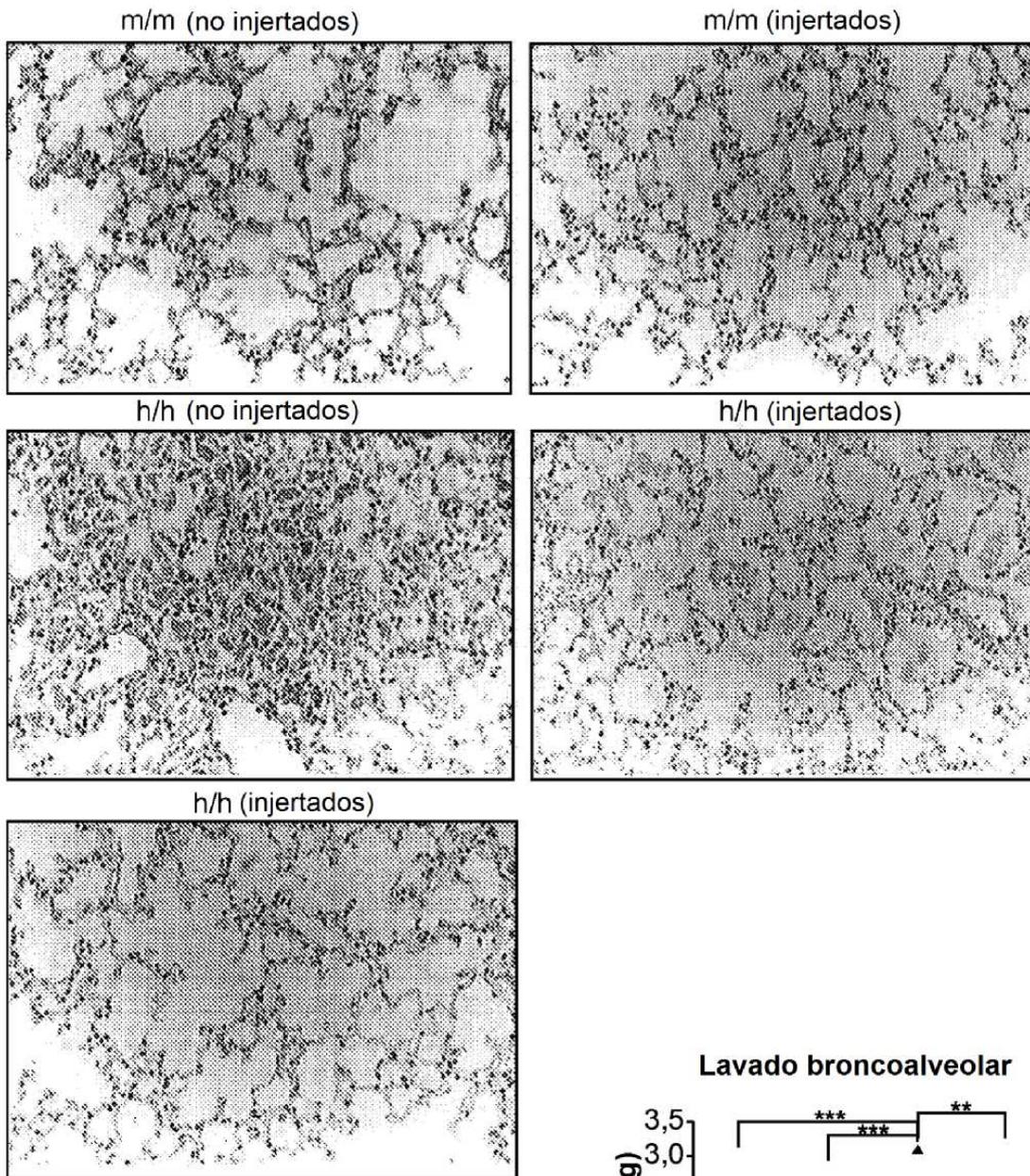


FIG. 7a

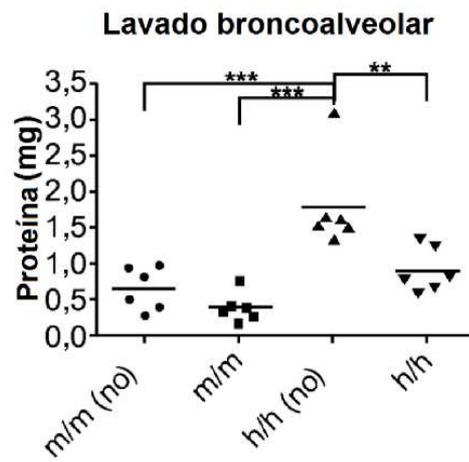


FIG. 7b

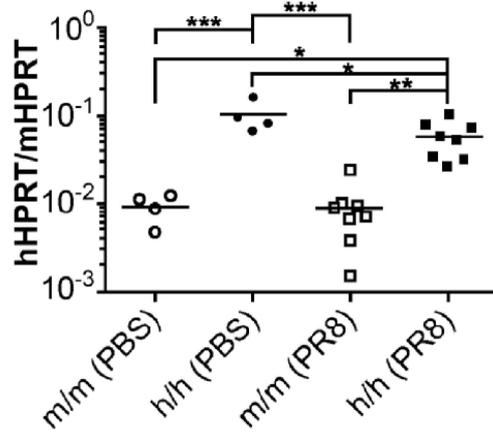


FIG. 8a

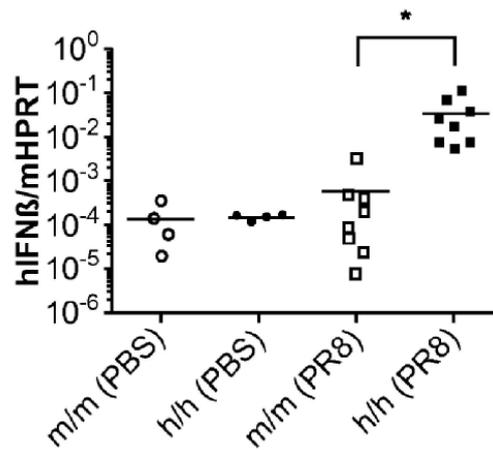


FIG. 8b

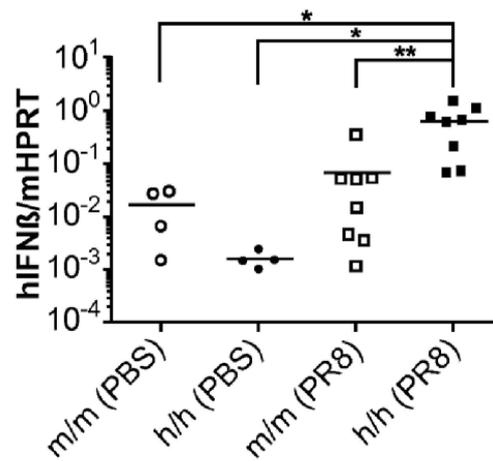


FIG. 8c

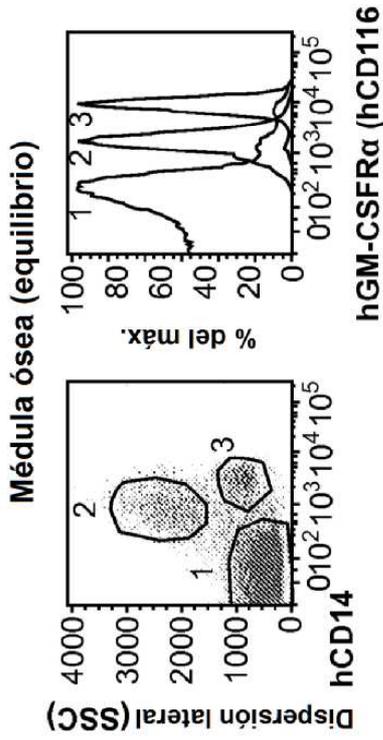


FIG. 8d

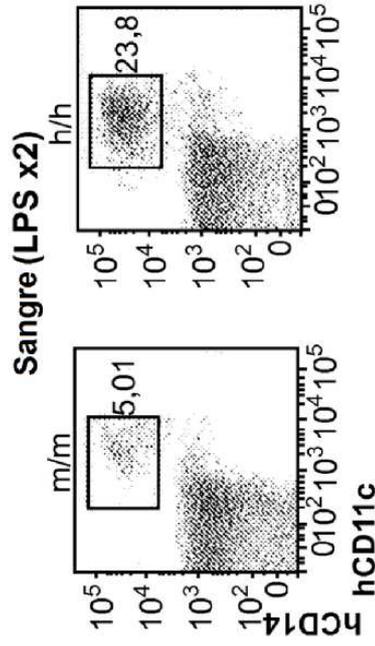


FIG. 8e

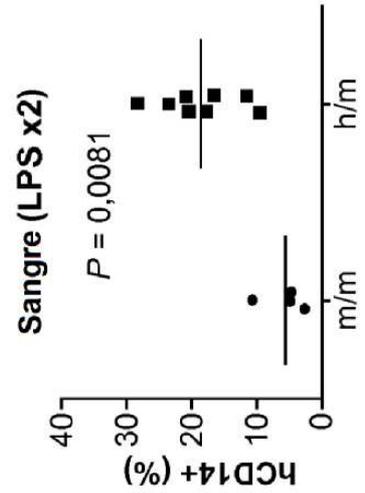


FIG. 8f

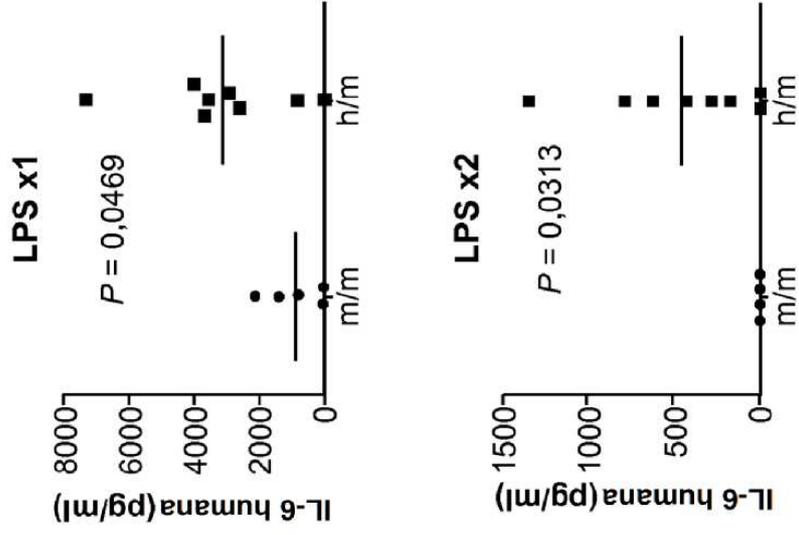
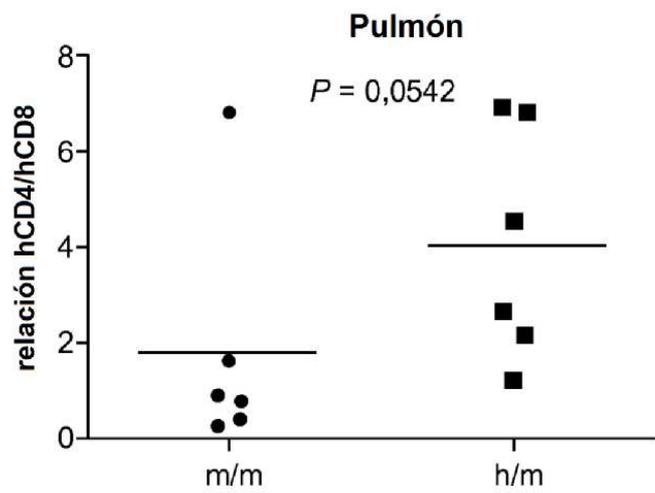
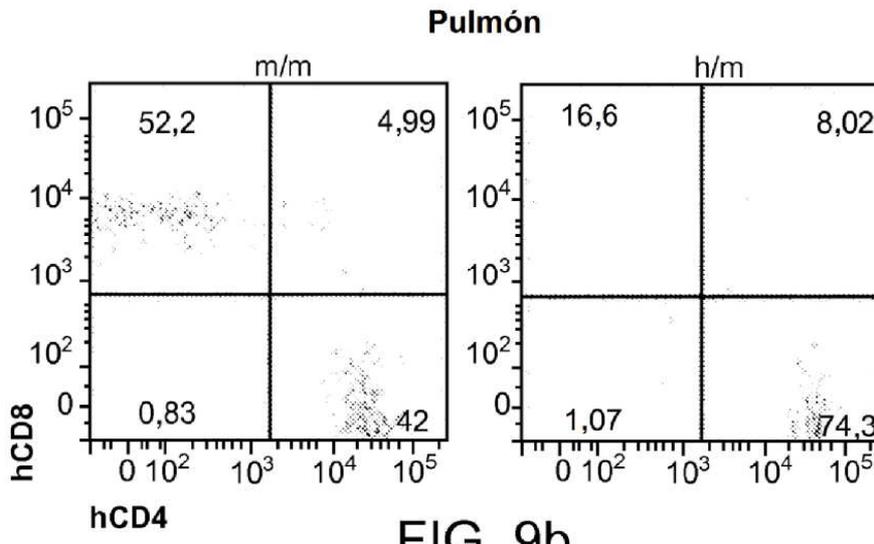
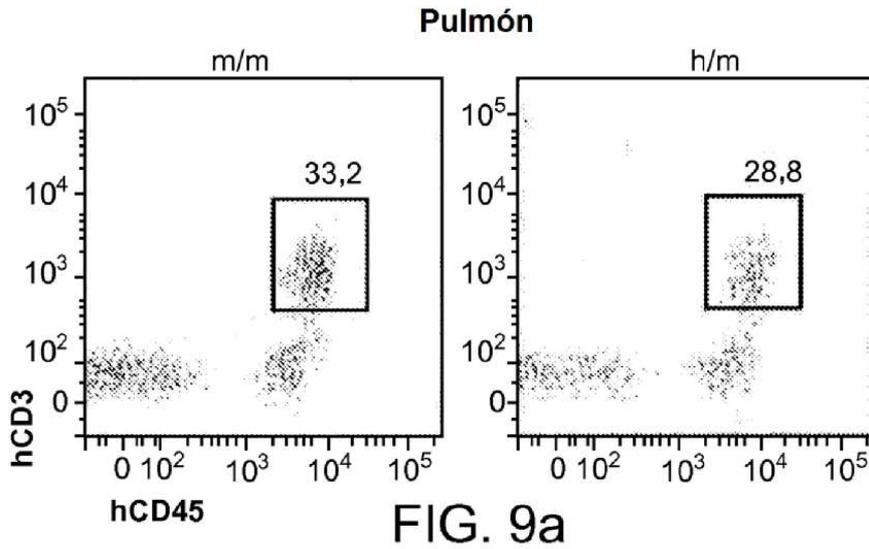


FIG. 8g



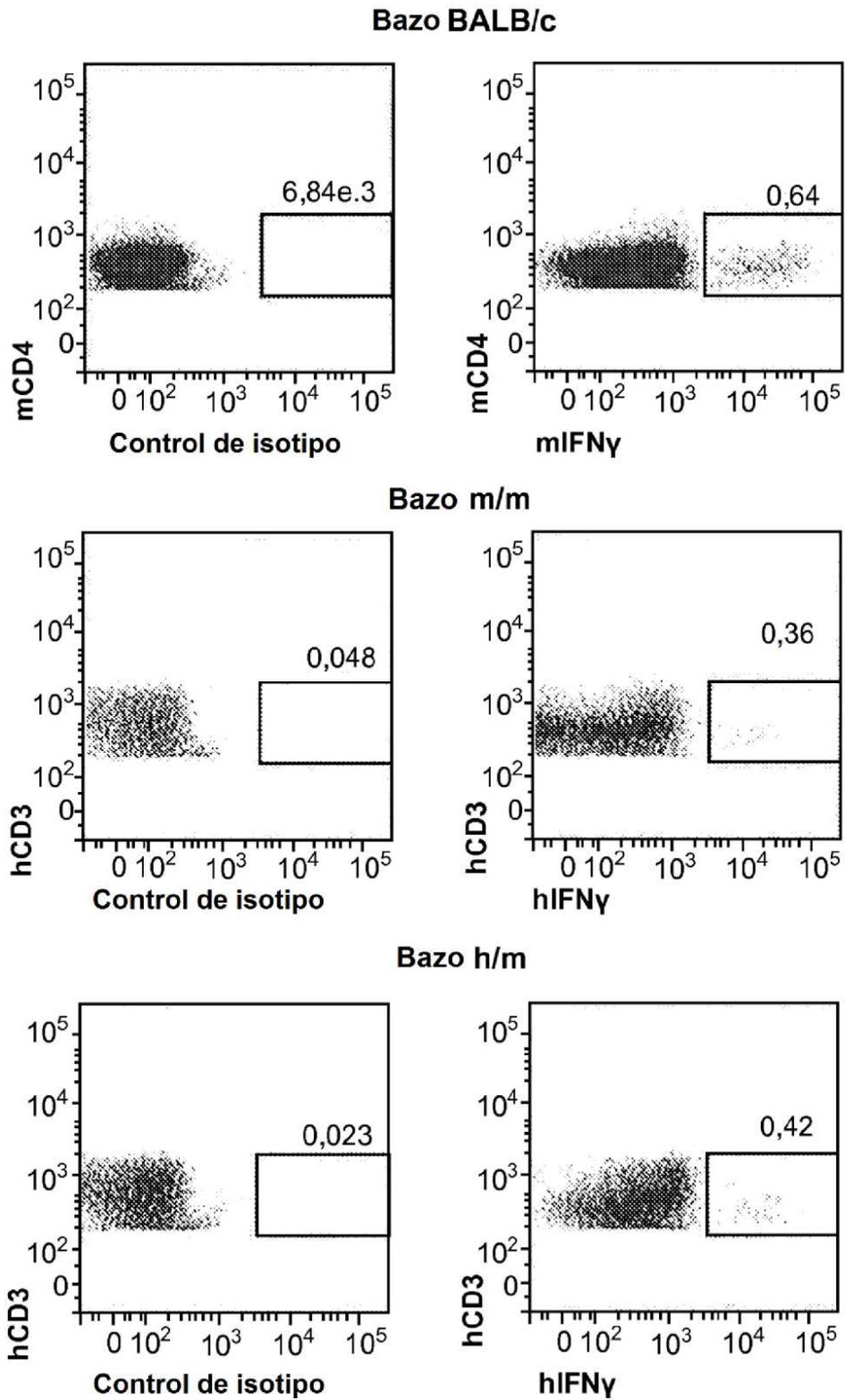


FIG. 9d

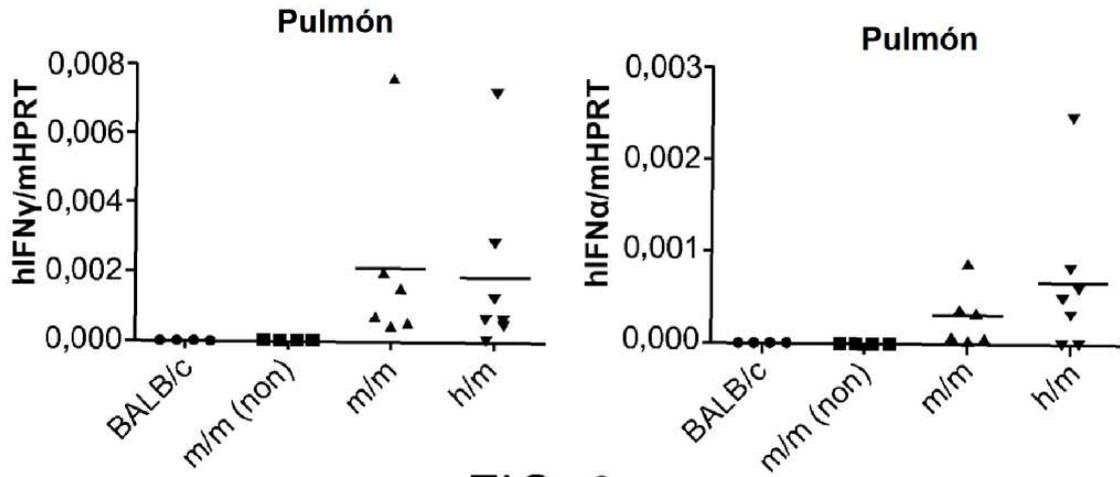


FIG. 9e

lavado broncoalveolar
(ratones no inyectados)

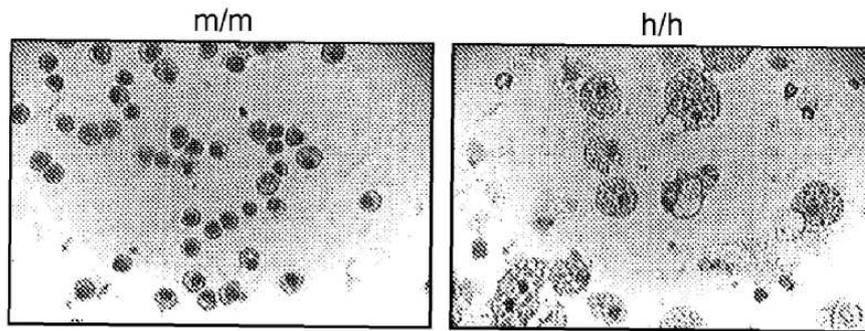


FIG. 9f

Pulmón
(ratones no inyectados)

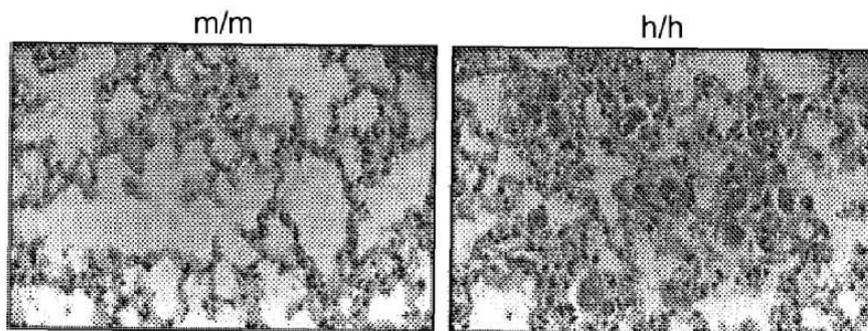


FIG. 9g

Pulmón h/m (H&E)

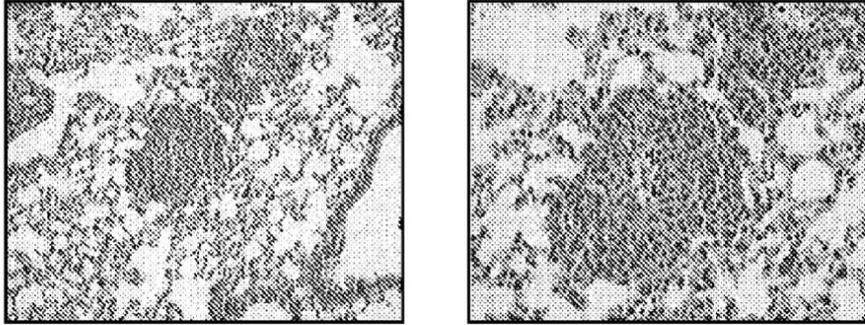
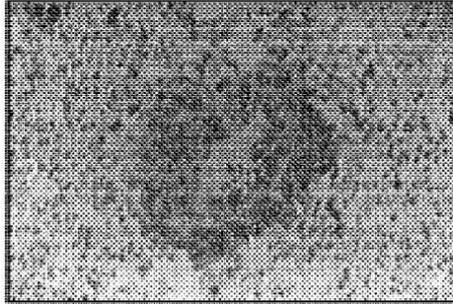
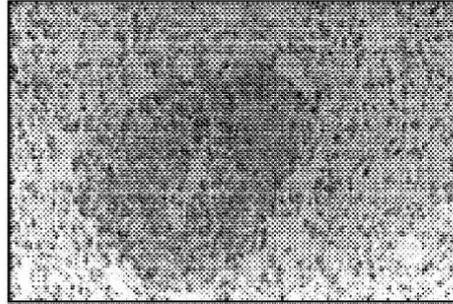


FIG. 10a

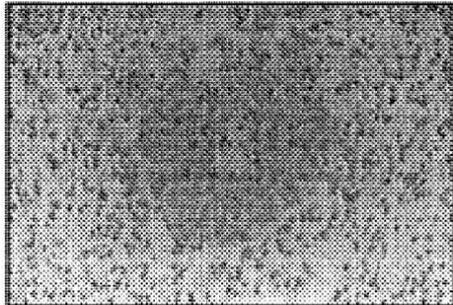
Pulmón h/m (hCD45)



Pulmón h/m (hCD3)



Pulmón m (hCD68)



Pulmón h/m (hCD68)

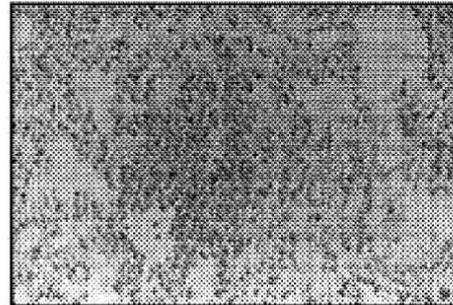


FIG. 10b

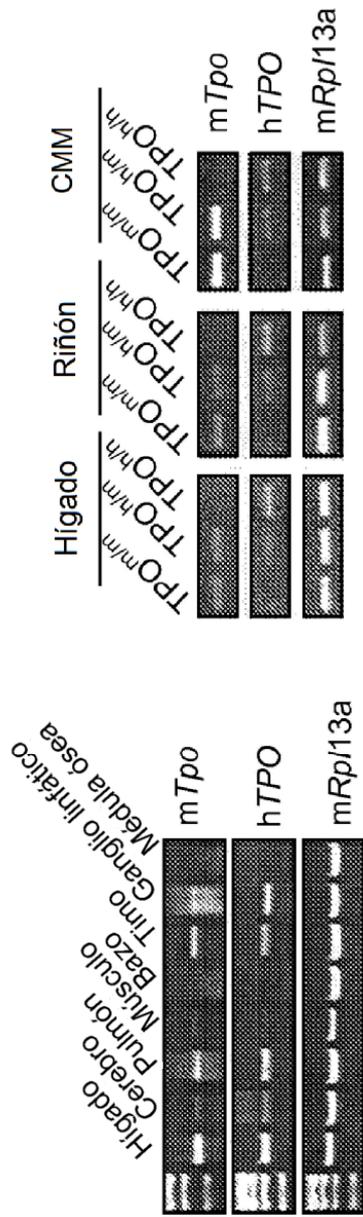


FIG. 11a

FIG. 11b

	TPO de ratón	TPO humana
TPO ^{m/m}	17011 ± 2171	ND
TPO ^{h/m}	11786 ± 1957	1577 ± 203
TPO ^{h/h}	ND	1429 ± 601
Intervalos normales	2972- 6645	ND - 228

FIG. 11c

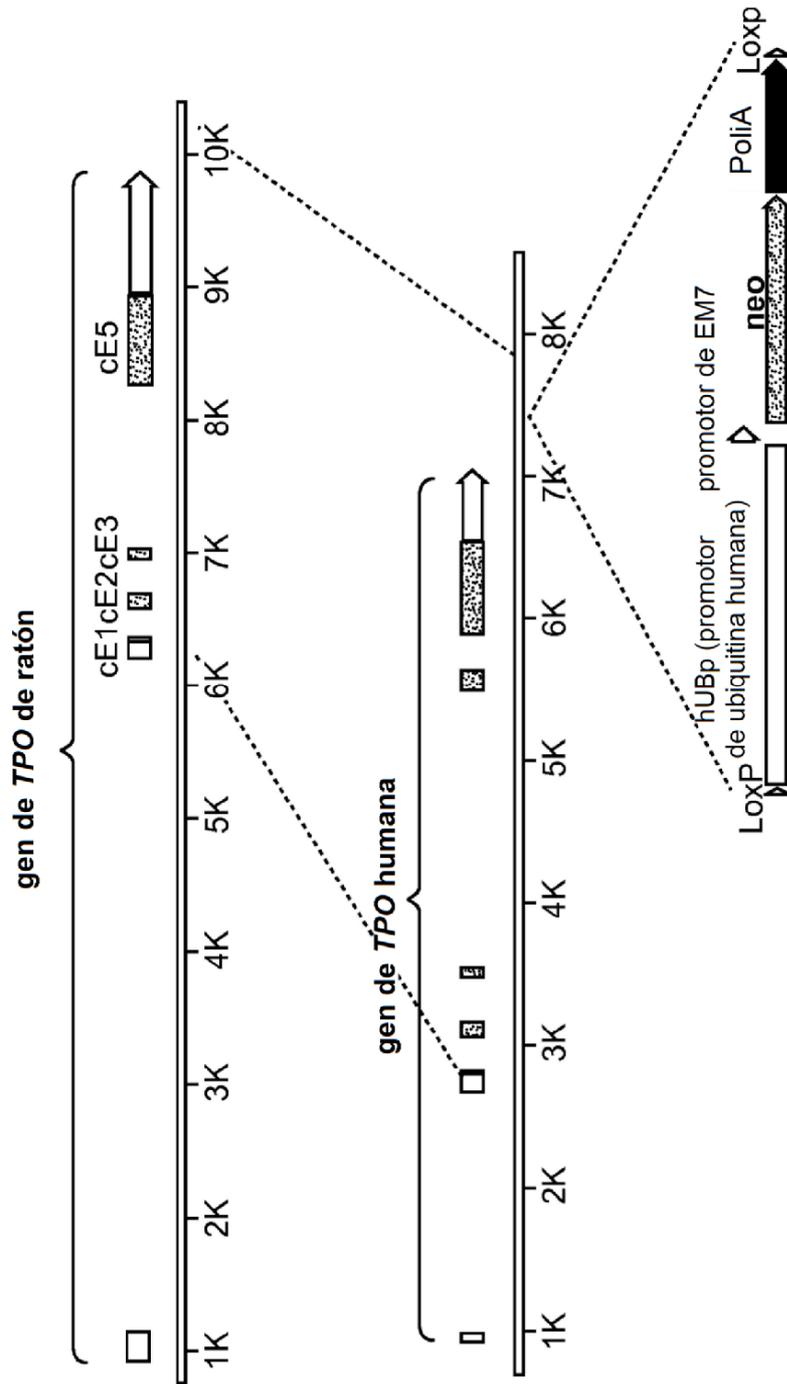


FIG. 11d

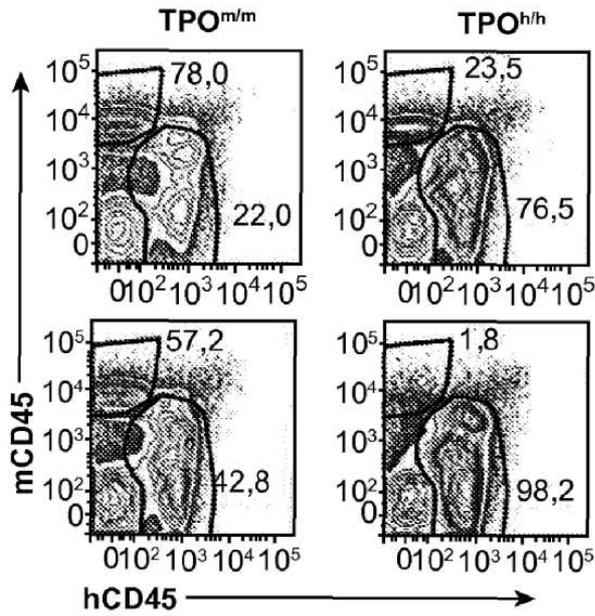


FIG. 12a

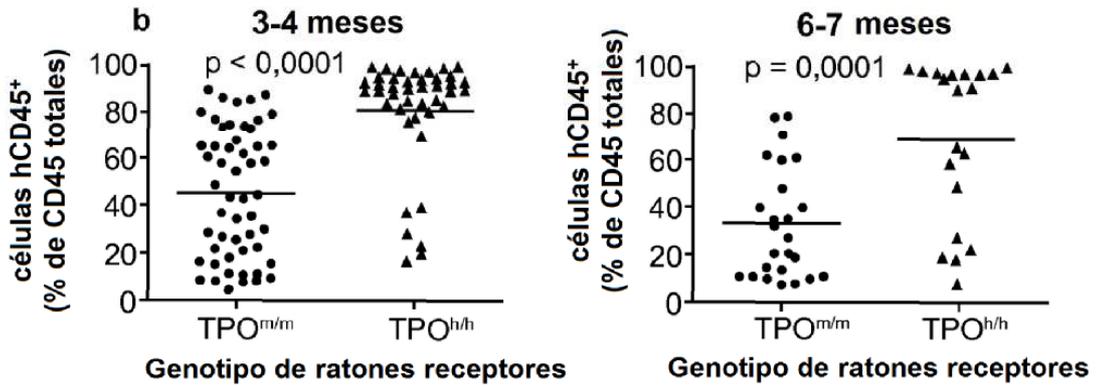


FIG. 12b

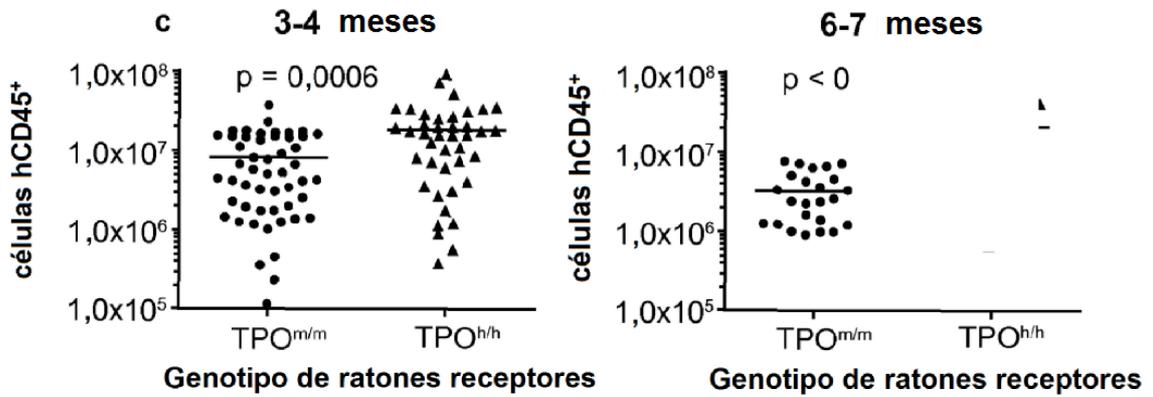


FIG. 12c

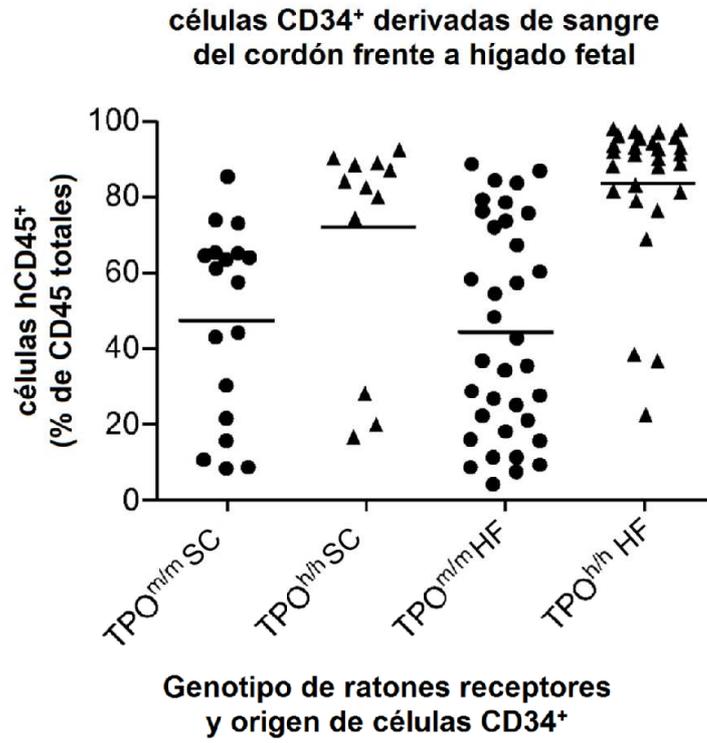


FIG. 12d

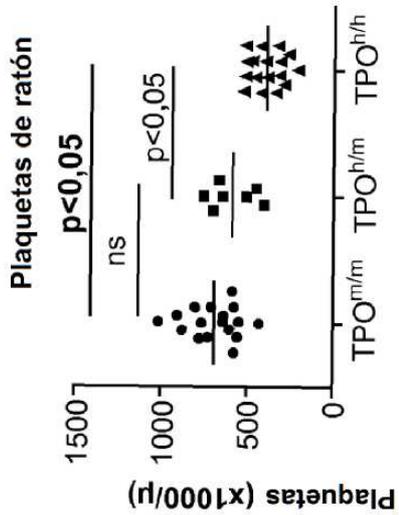


FIG. 13a

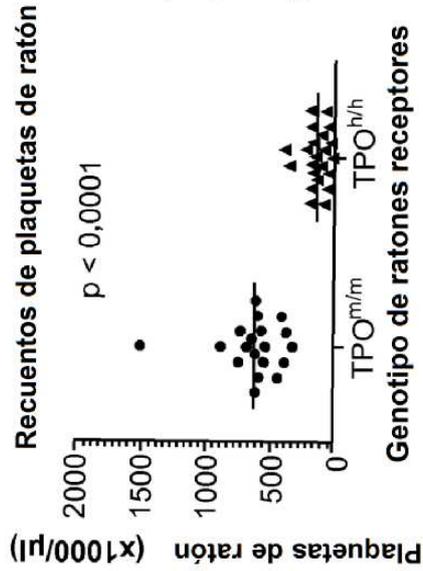


FIG. 13d

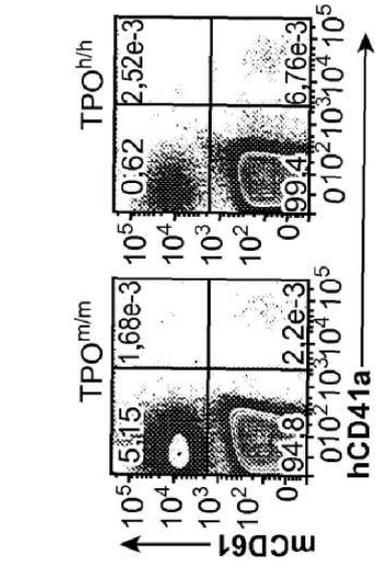


FIG. 13b

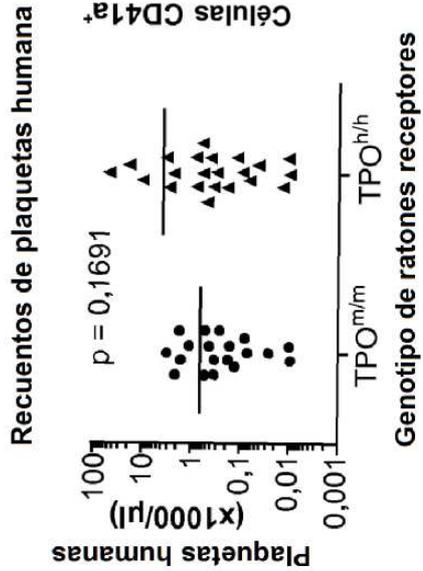


FIG. 13e

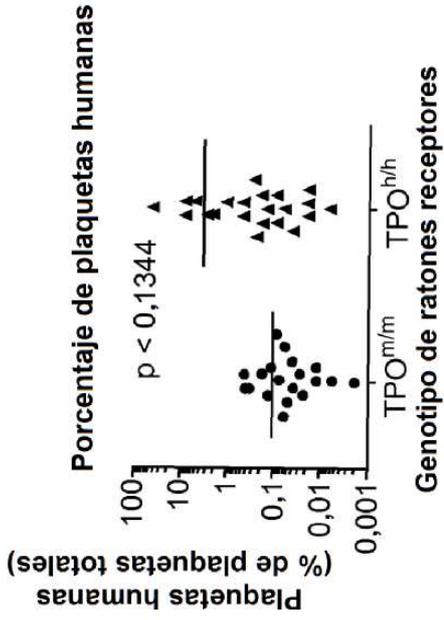


FIG. 13c

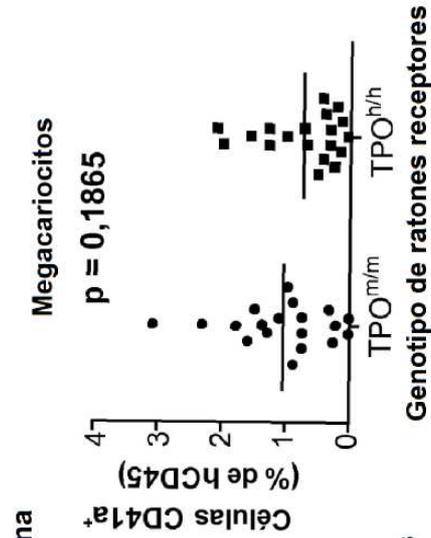


FIG. 13f

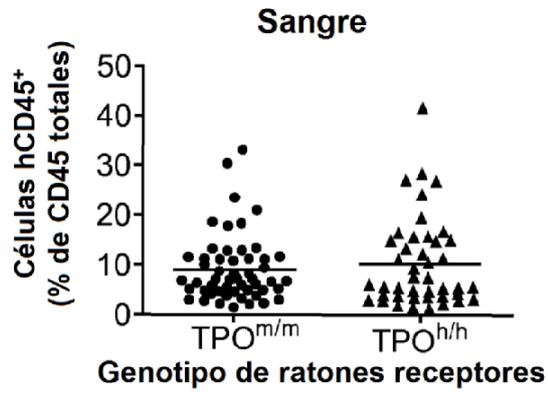


FIG. 13g

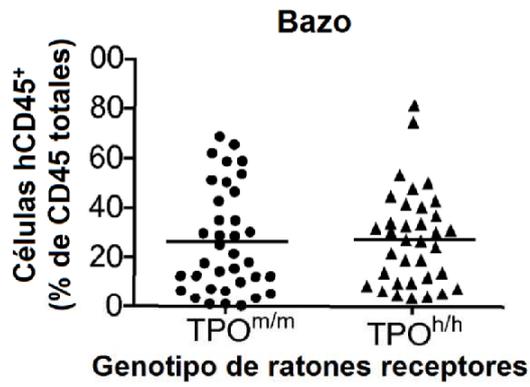


FIG. 13h

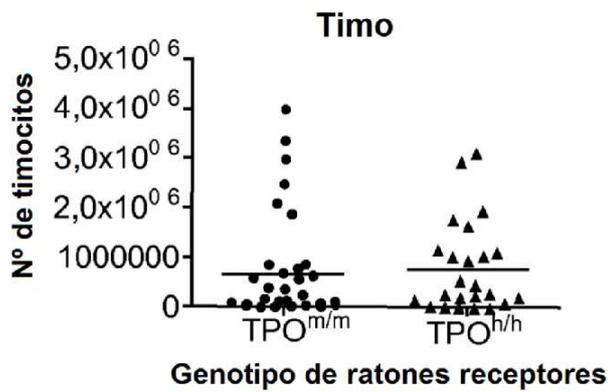


FIG. 13i

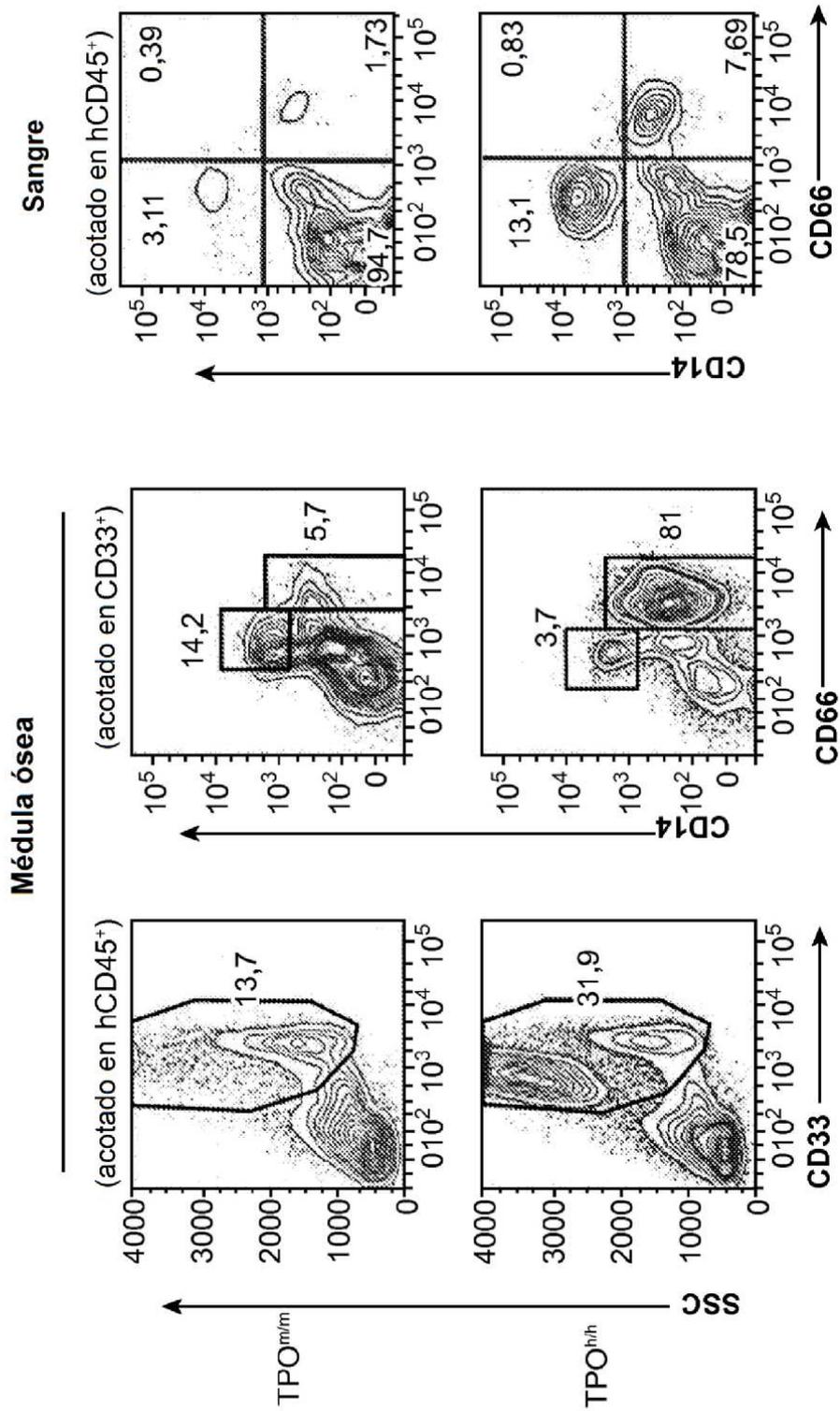


FIG. 14a

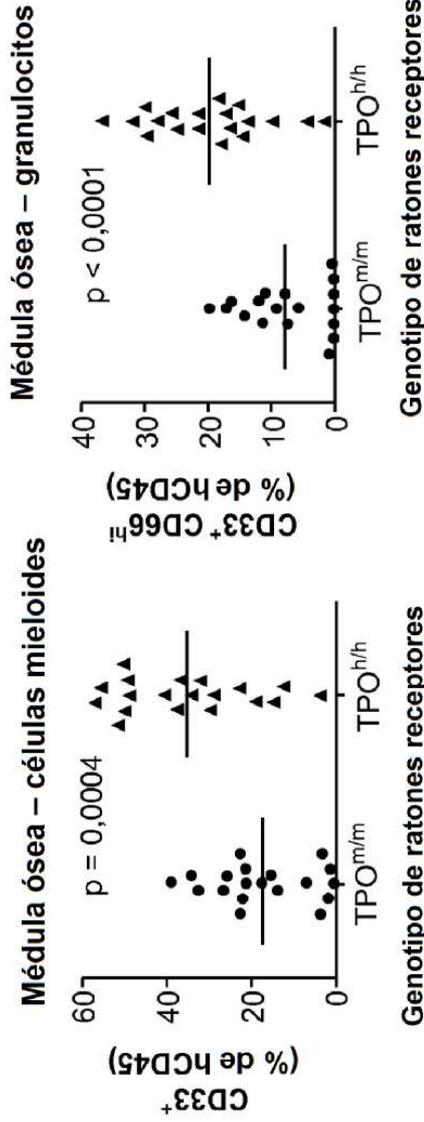


FIG. 14b

FIG. 14c

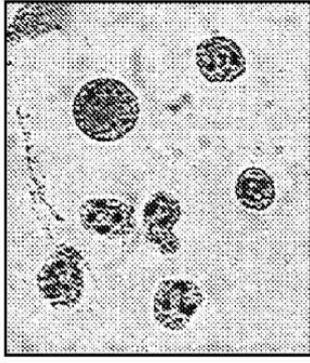


FIG. 14d

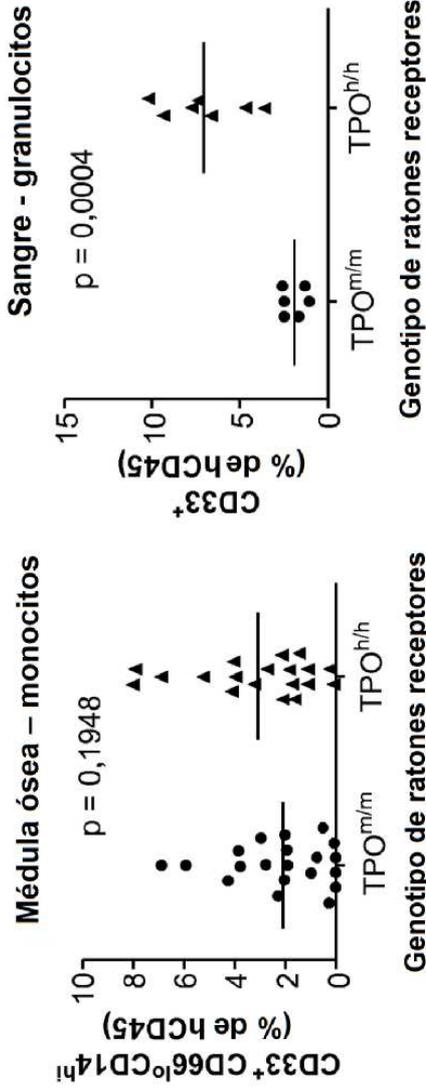


FIG. 14e

FIG. 14f

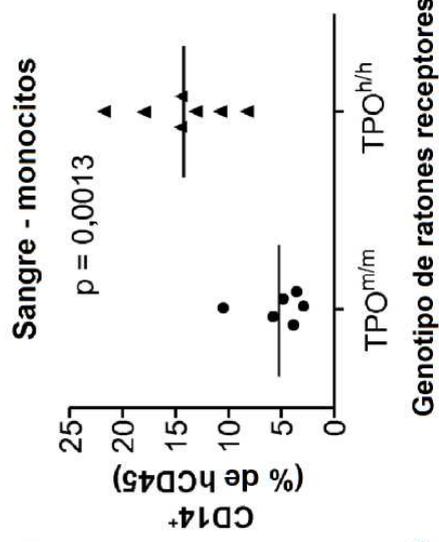
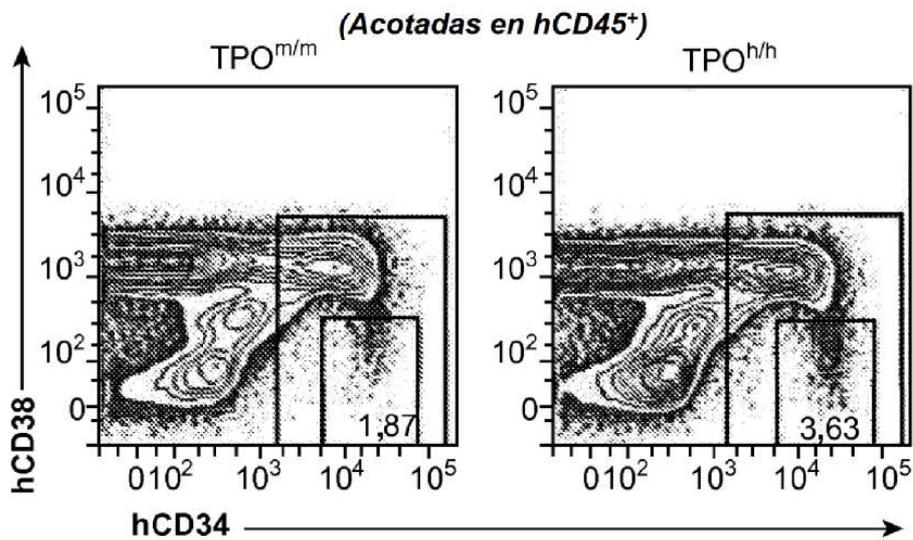
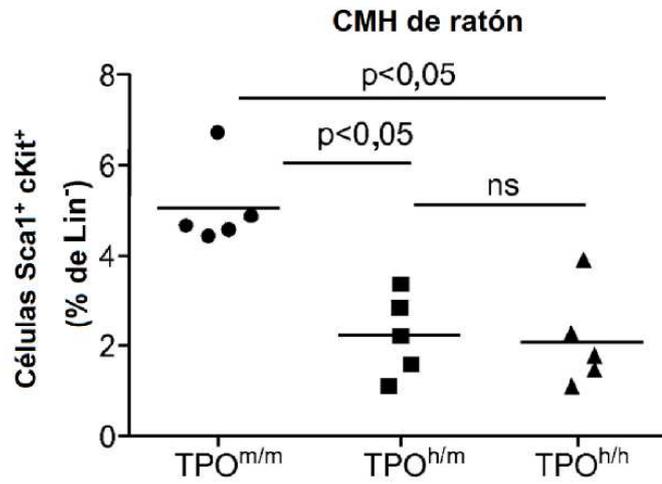
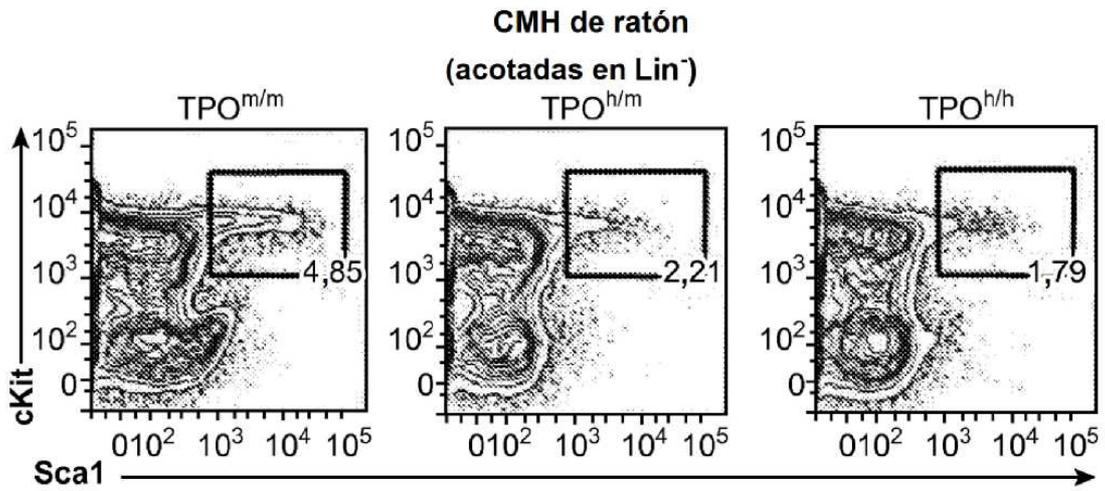


FIG. 14g



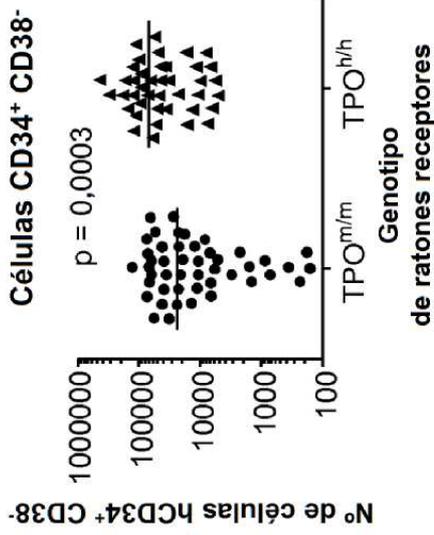


FIG. 15e

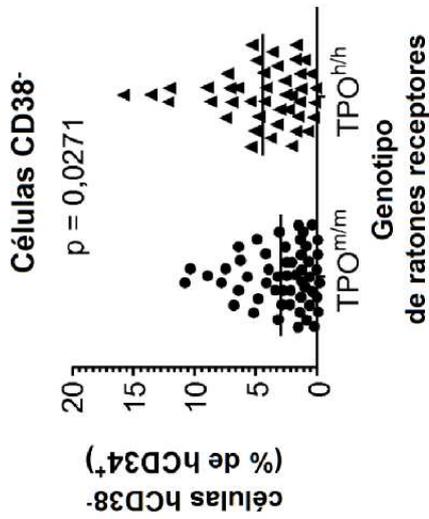


FIG. 15d

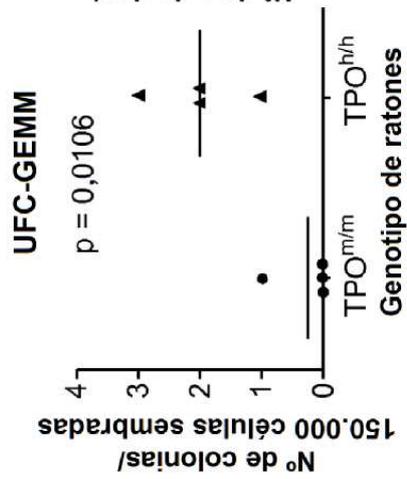


FIG. 15f

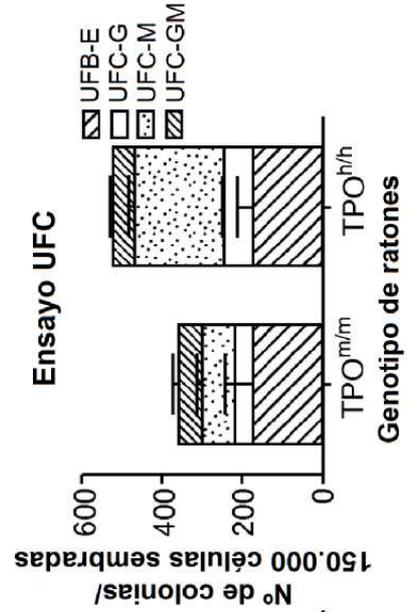


FIG. 15g

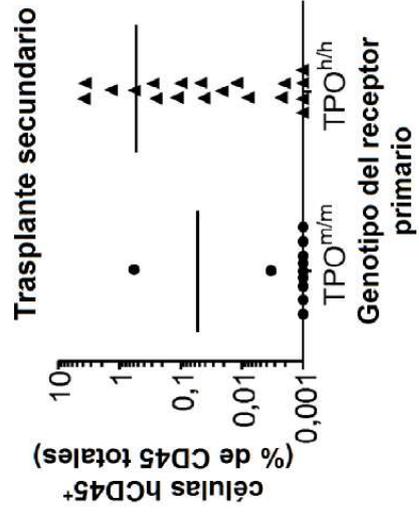


FIG. 15h