

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 732**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027	(2006.01)
C07K 14/535	(2006.01)
C07K 14/715	(2006.01)
C07K 14/54	(2006.01)
C07K 14/52	(2006.01)
C07K 14/505	(2006.01)
C12N 9/00	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01)
G01N 33/50	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2015 PCT/US2015/031429**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15179317**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2015 E 15756500 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 3145307**

54 Título: **Animales no humanos modificados genéticamente que expresan EPO humana**

30 Prioridad:

19.05.2014 US 201462000460 P

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

04.07.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MURPHY, ANDREW J.;
STEVENS, SEAN;
FLAVELL, RICHARD;
MANZ, MARKUS y
SHAN, LIANG

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 718 732 T3

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

DESCRIPCIÓN

Animales no humanos modificados genéticamente que expresan EPO humana

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al ámbito de animales no humanos modificados genéticamente.

10 **Introducción**

10 Se conocen en la técnica ratones genéticamente modificados, ratones modificados e injertados y su uso en el modelado de enfermedades humanas. Sin embargo, hasta la fecha, ha habido poco éxito en la generación de ratones genéticamente modificados que modelen infección humana por patógenos que se dirigen a células del linaje eritroide humano. Tales patógenos, por ejemplo, protozoos de los géneros *Plasmodium*, *Babesia* y *Theileria*, pueden provocar enfermedades mortales en seres humanos.

15 Por ejemplo, protozoos del género *Plasmodium* provocan malaria. Durante el 2010, se consideró que un total de 106 países eran endémicos de malaria con una estimación de 3,3 mil millones de población en riesgo de desarrollar la enfermedad. La carga de enfermedad en 2010 se estimó en 216 millones de casos con 655.000 fallecimientos estimados en todo el mundo, en los que, el 86 % fue en niños menores de 5 años. En la actualidad, los fármacos y vacunas para la prevención y tratamiento de la malaria son aún muy limitados. Además, se ha producido la resistencia del parásito a los terapéuticos comúnmente usados para la malaria y se presenta como un problema constante. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos fármacos y vacunas para el control y tratamiento de patógenos que se dirigen a eritrocitos humanos se necesitan urgentemente.

25 Puesto que muchos de estos patógenos no infectan los glóbulos rojos de roedores de laboratorio, los estudios *in vivo* se han limitado normalmente a estudios de malaria provocada por el parásito del roedor *Plasmodium berghei* ANKA, o a estudios de ratones NOD/SCID, NOD/SCID/IL2rg^{nu/0} (NSG) o BXN plenamente injertados mediante una inyección diaria de grandes cantidades de eritrocitos humanos y casualmente o posteriormente infectados por inyección de glóbulos rojos con parásitos (Angulo-Barturen et al. (2008) A murine model of falciparum-malaria by *in vivo* selection of competent strains in non-myelodepleted mice engrafted with human erythrocytes. PLoS One 3:e2252; Jimenez-Diaz et al. (2009) Improved murine model of malaria using *Plasmodium falciparum* competent strains and non-myelodepleted NOD-scid IL2Rgnull mice engrafted with human erythrocytes. Antimicrob Agents Chemother 53:4533-4536; Badell et al. (2000) Human malaria in immunocompromised mice: an *in vivo* model to study defense mechanisms against *Plasmodium falciparum*. JEM 192(11): 1653-1660; Moreno et al. (2006) The course of infections and pathology in immunomodulated NOD/ItSz-SCID mice inoculated with *Plasmodium falciparum* laboratory lines and clinical isolates. Int. J. Parasitol. 36: 361-369). Para estudiar los efectos del *Plasmodium* y otros patógenos sobre humanos y para someter a ensayo vacunas y fármacos para su eficacia en la prevención de infecciones y tratamiento de humanos infectados con estos y otros patógenos, sería útil tener un animal no humano tal como un ratón que esté genéticamente modificado de modo que sea susceptible de infección con tal patógeno o que soportará mejor eritrocitos humanos que se injertan plenamente al animal antes de su infección como se ha hecho en modelos de roedor tradicionales.

45 **Sumario**

45 Se proporcionan roedores genéticamente modificados que expresan EPO humana a partir del genoma animal. También se describen métodos de realizar animales no humanos que expresan EPO a partir del genoma animal no humano y métodos para usar animales no humanos que expresan EPO humana a partir del genoma animal no humano. Estos animales y métodos pueden encontrar muchos usos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, en el modelado de eritropoyesis humana y función de eritrocitos; en el modelado de infección de patógenos humanos de eritrocitos; en cribas *in vivo* para agentes que modulan la función de la eritropoyesis y/o eritrocitos, por ejemplo, en un estado saludable o enfermo; en cribas *in vivo* para agentes que son tóxicos para los eritrocitos o progenitores de eritrocitos; en cribas *in vivo* para agentes que evitan, mitigan o revierten los efectos tóxicos de agentes tóxicos en eritrocitos o progenitores de eritrocitos; en cribas *in vivo* de eritrocitos o progenitores de eritrocitos de un individuo para predecir la capacidad de respuesta de un individuo a una terapia de enfermedad.

Se proporcionan roedores genéticamente modificados que expresan EPO humana a partir del genoma del roedor. En otras palabras, el roedor comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de EPO humana.

60 La secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de EPO humana está unida operativamente a un promotor del gen EPO en donde el promotor EPO es el endógeno, es decir, promotor de EPO de roedor. El promotor de EPO endógeno se encuentra en el locus del gen EPO del roedor. En otras palabras, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína EPO humana está unida operativamente al promotor de EPO del roedor en el locus EPO del roedor. La unión operativa da como resultado una mutación nula en el gen EPO no humano en el locus del gen EPO no humano.

En algunas realizaciones, el roedor sujeto es heterocigótico para el alelo que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína EPO humana. En otras realizaciones, el roedor es homocigótico para el alelo que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína EPO humana.

- 5 En algunas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína EPO humana comprende secuencia codificante y no codificante genómica de EPO humana. En otras realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína EPO humana comprende secuencia de ADNc EPO humana.

10 El roedor sujeto expresa las proteínas humanas adicionales de una proteína M-CSF codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de *M-csf*, una proteína de IL-3 codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de la IL-3, una proteína GM-CSF codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de *Gm-csf*, una proteína TPO codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor TPO, y una proteína Sirpa codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor *Sirpa*. En algunas de dichas realizaciones, el promotor es un promotor de roedor endógeno en el locus del gen del roedor correspondiente y el roedor es heterocigótico nulo para el gen de roedor. En otras realizaciones, el promotor es un promotor de roedor endógeno en el locus de gen correspondiente y es heterocigótico nulo para el gen de roedor. El roedor expresa TPO humana, por ejemplo, humanizada; IL-3 humana, por ejemplo, humanizada; GM-CSF humana, por ejemplo, humanizada; EPO humana, por ejemplo, humanizada; y Sirpa humana, por ejemplo, humanizada.

20 En algunas realizaciones, el roedor sujeto genéticamente modificado es un ratón que tiene un genoma que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una EPO humana, por ejemplo, humanizada; una Sirpa humana, por ejemplo, humanizada; una IL-3 humana, por ejemplo, humanizada; un GM-CSF humano, por ejemplo, humanizado, un M-CSF humano, por ejemplo, humanizado, una TPO humana, por ejemplo, humanizada, y una IL-6 humana, por ejemplo, humanizada; unida operativamente a su promotor de ratón correspondiente, por ejemplo, promotor de *Sirpa*, *IL-3*, *GM-CSF*, *M-CSF*, *TPO* o *IL-6*, respectivamente, en donde el animal expresa la(s) proteína(s) humana(s) codificada(s) y la(s) proteína(s) de ratón nativa(s). En otras realizaciones, el roedor sujeto genéticamente modificado es un ratón que tiene un genoma que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una EPO humana, por ejemplo, humanizada; Sirpa humana, por ejemplo, humanizada; IL-3 humana, por ejemplo, humanizada; GM-CSF humano, por ejemplo, humanizado; M-CSF humano, por ejemplo, humanizado; y TPO humana, por ejemplo, humanizada, unida operativamente a su promotor de ratón correspondiente, por ejemplo, promotor de *Sirpa*, *IL-3*, *GM-CSF*, *M-CSF* o *TPO*, respectivamente, en donde el ratón expresa la(s) proteína(s) humana(s) codificada(s) y no expresa la(s) proteína(s) de ratón nativa(s). Por lo tanto, en algunas realizaciones, el roedor modificado genéticamente es un ratón y el ratón es heterocigótico para algunos o todos los genes humanos, por ejemplo, humanizados, que se desvelan en el presente documento. En algunas realizaciones, el roedor modificado genéticamente es un ratón y el ratón es homocigótico para algunos o todos los genes humanos, por ejemplo, humanizados, que se desvelan en el presente documento.

El roedor sujeto es inmunodeficiente para un sistema inmune endógeno y la inmunodeficiencia es provocada por una deficiencia de uno o ambos de Rag2 e IL2rg.

40 En algunas realizaciones, el roedor sujeto inmunodeficiente genéticamente modificado comprende adicionalmente un injerto de células hematopoyéticas humanas. En algunas de dichas realizaciones, las células hematopoyéticas humanas comprenden una o más células seleccionadas entre el grupo que consiste en células CD34 positivas humanas, una célula madre hematopoyética humana, una célula precursora mieloide humana, una célula precursora eritroide humana, una célula mieloide humana, una célula dendrítica humana, un monocito humano, un granulocito humano, un eritrocito humano, un neutrófilo humano, una célula mastocito humana, un timocito humano y un linfocito B humano.

50 Como se demuestra en los ejemplos prácticos del presente documento, roedores inmunodeficientes modificados genéticamente injertados con células hematopoyéticas humanas que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifican una proteína EPO humana unida operativamente a un promotor EPO en el locus endógeno demuestran altos niveles de eritropoyesis humana en la médula ósea y un aumento de 2 a 5 veces en células humanas en el linaje eritroide en médula ósea en comparación con ratones de control que no expresan EPO humana. En algunas realizaciones, roedores inmunodeficientes modificados genéticamente injertados con células hematopoyéticas humanas que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína EPO humana unida operativamente a un promotor EPO en el locus endógeno demuestran altos niveles de eritropoyesis humana en la médula ósea y un aumento de aproximadamente de 2 a 10 veces en células humanas en el linaje eritroide en la médula ósea en comparación con ratones de control que no expresan EPO humana, por ejemplo, un aumento de aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 8 veces, aproximadamente 9 veces o aproximadamente 10 veces en células humanas del linaje eritroide en médula ósea en comparación con ratones de control que no expresan EPO humana. Por tanto, en algunas realizaciones, el sujeto injertado, roedor inmunodeficiente genéticamente modificado comprende médula ósea en la que el 20 % o más de células eritroides (CD235+) son células eritroides humanas. En algunas realizaciones, el sujeto injertado, roedor inmunodeficiente genéticamente modificado comprende médula ósea en la que aproximadamente el 10 % o más, por ejemplo, aproximadamente el 20 % o más, aproximadamente el 30 % o más, aproximadamente el 40 % o más o

aproximadamente el 50 % o más de las células eritroides (CD235+) son células eritroides humanas.

En el presente documento se desvela un ratón inmunodeficiente que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína EPO unida operativamente al promotor EPO de animal no humano en el locus EPO de animal no humano, un ácido nucleico que codifica una proteína TPO humana unida operativamente al promotor TPO de animal no humano en el locus TPO de animal no humano, un ácido nucleico que codifica una proteína de IL-3 humana unida operativamente al promotor de IL-3 de animal no humano en el locus de IL-3 de animal no humano, un ácido nucleico que codifica una proteína de GM-CSF humana unida operativamente a un promotor de GM-CSF en el locus GM-CSF de animal no humano y un ácido nucleico que codifica una proteína M-CSF humana unida operativamente al promotor de M-CSF de animal no humano en el locus de M-CSF de animal no humano, por ejemplo, un ratón Rag2^{-/-} IL2rg^{y/-} Tpo^{h/h} Mcsf^{h/h} Il3^{h/h} Gmcsf^{h/h} Epo^{h/h} ("MITER-G").

En algunas de dichas realizaciones, el roedor sujeto genéticamente modificado es un ratón inmunodeficiente que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína EPO unida operativamente al promotor EPO de ratón en el locus EPO de ratón, un ácido nucleico que codifica una proteína TPO humana unida operativamente al promotor TPO de ratón en el locus TPO de ratón, un ácido nucleico que codifica una proteína de IL-3 humana unida operativamente al promotor de IL-3 de ratón en el locus de IL-3 de ratón, un ácido nucleico que codifica una proteína GM-CSF humana unida operativamente a un promotor GM-CSF en el locus GM-CSF de ratón y un ácido nucleico que codifica una proteína M-CSF humana unida operativamente al promotor de M-CSF de ratón en el locus M-CSF de ratón, y un ácido nucleico que codifica una proteína SIRPa humana unida operativamente al promotor SIRPa de ratón integrado aleatoriamente en el genoma de ratón, por ejemplo, un ratón Rag2^{-/-} IL2rg^{y/-} Tpo^{h/h} Mcsf^{h/h} Il3^{h/h} Gmcsf^{h/h} Epo^{h/h} hSIRPa⁺ ("MISTER-G"). En otras realizaciones de este tipo, el ácido nucleico que codifica una proteína SIRPa humana, por ejemplo, humanizada, está unido operativamente al promotor SIRPa de ratón en el locus de ratón, por ejemplo, un ratón Rag2^{-/-} IL2rg^{y/-} Tpo^{h/h} Mcsf^{h/h} Il3^{h/h} Gmcsf^{h/h} Epo^{h/h} SIRPa^{h/h} ("SupER-G").

En el presente documento se desvela un ratón inmunodeficiente que comprende un alelo de un ácido nucleico que codifica una proteína EPO unida operativamente al promotor EPO de animal no humano en el locus EPO de animal no humano (es decir, el ratón es heterocigótico para EPO humana), un ácido nucleico que codifica una proteína SIRPa humana, por ejemplo, humanizada, unida operativamente al promotor SIRPa de animal no humano en el locus SIRPa de animal no humano, un ácido nucleico que codifica una proteína TPO humana unida operativamente al promotor TPO de animal no humano en el locus TPO de animal no humano, un ácido nucleico que codifica una proteína de IL-3 humana unida operativamente al promotor de IL-3 de animal no humano en el locus IL-3 de animal no humano y un ácido nucleico que codifica una proteína GM-CSF humana unida operativamente a un promotor de GM-CSF en el locus de M-CSF de animal no humano, por ejemplo, un ratón Rag2^{-/-} IL2rg^{y/-} Tpo^{h/h} Il3^{h/h} Gm-csf^{h/h} Epo^{h/m} SIRPa^{h/h} ("TIES").

En algunas realizaciones, los roedores inmunodeficientes genéticamente modificados injertados celulares hematopoyéticos humanos comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifican una proteína EPO humana unida operativamente a un promotor de EPO en el locus endógeno pueden demostrar una mejor supervivencia e injerto con eritrocitos humanos cuando comprenden solo una copia de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína EPO y cuando comprenden M-csf endógeno. Esto se debe al alto nivel de injerto celular mielóide humano soportado por M-CSF humano en los resultados de activación en la destrucción de glóbulos rojos de ratones, que, a su vez, lleva a anemia y muerte de ratones injertados. Además, la heterocigosidad del alelo de EPO humana mejora la fertilidad, competencia de desarrollo y viabilidad sobre ratones homocigóticos para EPO humana y nulos para EPO de ratón. Por tanto, en algunas realizaciones, el sujeto injertado, animal inmunodeficiente genéticamente modificado demuestra una viabilidad mejorada sobre ratones que expresan de forma constituyente EPO, por ejemplo, ratones transgénicos o ratones que comprenden dos copias de EPO humana, por ejemplo, EPO^{h/h}. En algunas divulgaciones, el animal no humano inmunodeficiente genéticamente modificado es el ratón TIES (Rag2^{-/-} IL2rg^{y/-} Tpo^{h/h} Il3^{h/h} Gm-csf^{h/h} Epo^{h/m} SIRPa^{h/h}).

En algunas realizaciones, los roedores inmunodeficientes genéticamente modificados injertados con células hematopoyéticas humanas con liposomas de clodronato muestran un aumento de 1000 veces en el número de células eritroides humanas (CD235+) en la sangre periférica en comparación con roedores no inyectados. En algunas realizaciones, roedores inmunodeficientes genéticamente modificados injertados con células hematopoyéticas humanas inyectados con liposomas de clodronatos muestran un aumento de aproximadamente 10 veces o más, aproximadamente 50 veces o más, aproximadamente 100 veces o más, aproximadamente 500 veces o más o aproximadamente 1000 veces o más en el número de células eritroides humanas (CD235+) en la sangre periférica en comparación con animales no inyectados. De estas células eritroides humanas, el 10 % o más, el 20 % o más, el 30 % o más, el 40 % o más o el 50 % o más pueden ser reticulocitos (precursores de eritrocitos, CD71+). Por tanto, en algunas realizaciones, el sujeto injertado, roedor inmunodeficiente genéticamente modificado comprende sangre periférica en la que el 1 % o más, por ejemplo, el 5 % o más o el 10 % o más, de células eritroides (CD235+) son células eritroides humanas y el 10 % o más, por ejemplo, 20 % o más, 30 % o más, del 40 % o más o del 50 % o más, de esas células eritroides humanas son reticulocitos humanos (CD71+). En algunas de dichas realizaciones, el roedor sujeto inmunodeficiente injertado genéticamente modificado es el ratón MISTER-G, o ratón SupER-G.

En algunas realizaciones, el roedor comprende adicionalmente una infección con un patógeno que se dirige a

células humanas del linaje eritroide. En algunas de dichas realizaciones, el patógeno se selecciona entre una especie de *Plasmodium*, una especie de *Babesia* y una especie de *Theileri*. En algunas divulgaciones, la infección se produce inyectando el parásito en el animal no humano. En algunas divulgaciones, la infección se produce inyectando células eritroides humanas con parásitos en el animal no humano. En algunas divulgaciones, la infección se produce inyectando células eritroides humanas con parásitos y células eritroides humanas sanas en el animal no humano.

En el presente documento se desvelan métodos para identificar un agente que inhibe una infección por un patógeno que se dirige a células humanas del linaje eritroide.

En algunas divulgaciones, el método comprende la administración de un agente candidato a un animal no humano genéticamente modificado, en donde el animal comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína EPO unida operativamente a un promotor de gen EPO, una o más mutaciones genéticas que dan como resultado la inmunodeficiencia en el animal no humano, un injerto de células hematopoyéticas humanas y una infección por un patógeno que se dirige a células humanas del linaje eritroide; y determinar si el agente reduce la cantidad del patógeno en el animal no humano infectado con patógeno.

En algunas divulgaciones, el método comprende poner en contacto un animal no humano inmunodeficiente genéticamente modificado, con injerto de células hematopoyéticas humanas que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína EPO humana unida operativamente a un promotor de gen EPO con clodronato; administrar un agente candidato al animal no humano puesto en contacto con el clodronato; inyectar al animal no humano genéticamente modificado reticulocitos o eritrocitos con parásitos; y determinar si el agente previene la infección de los reticulocitos/eritrocitos humanos del animal no humano.

En algunas divulgaciones, el patógeno se selecciona entre una especie de *Plasmodium*, una especie de *Babesia* y una especie de *Theileri*. En algunas tales divulgaciones, el patógeno se selecciona de *P. falciparum* y *P. vivax*. En algunas divulgaciones, el animal no humano es un mamífero. En algunas divulgaciones, el mamífero es un roedor. En determinadas divulgaciones, el roedor es un ratón.

En el presente documento se desvela un método para fabricar un ratón que expresa EPO humana. En algunas divulgaciones, el método comprende poner en contacto una célula madre pluripotente de ratón con una secuencia de ácido nucleico que comprende secuencia codificante para una proteína EPO humana o un fragmento de la misma unida operativamente a secuencia de promotor EPO, en donde la secuencia codificante y la secuencia de promotor EPO forman un casete que está flanqueado por secuencias que son homólogas con respecto al locus EPO de ratón endógeno; cultivar la célula madre pluripotente en condiciones de promueven la integración de la secuencia de ácido nucleico en el genoma de ratón en el locus EPO de ratón endógeno mediante recombinación homóloga; y fabricar un ratón a partir de la célula madre pluripotente de ratón que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína EPO humana.

En algunas divulgaciones, la célula madre pluripotente de ratón en una célula madre embrionaria (ES) o una célula madre pluripotente inducida (iPS). En algunas divulgaciones, la célula madre pluripotente de ratón es deficiente de Rag2 y/o IL2rg. En algunas divulgaciones, la secuencia de promotor de EPO es secuencia para el promotor de EPO humana. En otras divulgaciones, la secuencia de promotor de EPO humana es secuencia para el promotor de EPO no humana endógena. En algunas divulgaciones, la integración da como resultado una sustitución del gen EPO no humano en el locus del gen EPO no humano. En algunas divulgaciones, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína EPO humana comprende secuencia codificante y no codificante genómica de EPO humana. En algunas divulgaciones, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína EPO humana comprende secuencia de ADNc EPO humana.

En el presente documento se desvelan métodos para fabricar un ratón que expresa una proteína EPO humana y que comprende un sistema hematopoyético humano. En algunas divulgaciones, los métodos comprenden el trasplante de una población de células que comprenden células progenitoras hematopoyéticas humanas en el ratón inmunodeficiente genéticamente modificado fabricadas mediante métodos de la presente invención. En algunas divulgaciones, el trasplante comprende inyección de vena caudal, inyección de hígado fetal o inyección retro-orbital. En algunas realizaciones, el ratón inmunodeficiente genéticamente modificado se irradia subletalmente antes de su trasplante. En algunas divulgaciones, las células progenitoras hematopoyéticas humanas que se trasplantan son células CD34+. En algunas divulgaciones, las células progenitoras hematopoyéticas humanas son células progenitoras de hígado fetal, médula ósea adulta o sangre de cordón umbilical.

En el presente documento se desvelan métodos para fabricar un ratón que se infecta con un patógeno humano que se dirige a células humanas del linaje eritroide. En algunas divulgaciones, los métodos comprenden fabricar un ratón que expresa una proteína EPO humana y que comprende un sistema hematopoyético humano de acuerdo con métodos de la presente divulgación, inyectar el ratón injertado con clodronato e inyectar el ratón inyectado con clodronato con glóbulos rojos humanos con parásitos (PRBC). En algunas divulgaciones, el método comprende adicionalmente inyectar al ratón glóbulos rojos humanos sanos. En algunas divulgaciones, el parásito se selecciona entre una especie de *Plasmodium*, una especie de *Babesia* y una especie de *Theileri*. En determinadas

divulgaciones, la especie de *Plasmodium* se selecciona de *P. falciparum* y *P. vivax*.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La invención se entiende mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lee junto con los dibujos adjuntos. Se enfatiza que, de acuerdo con la práctica común, varios rasgos de los dibujos no están a escala. Por el contrario, las dimensiones de los diversos elementos están aumentadas o reducidas arbitrariamente para mayor claridad. En los dibujos se incluyen las siguientes figuras.
- 10 La **Figura 1** proporciona una alineación de proteínas del ratón Epo (SEQ ID NO:2) con respecto a EPO humana (SEQ ID NO:4). Los restos subrayados son restos que se conservan entre especies.
La **Figura 2** proporciona un esquema del locus EPO de ratón de tipo silvestre antes y después de la activación de una secuencia de ácido nucleico que codifica EPO humana.
La **Figura 3** proporciona un esquema del alelo de activación de EPO humana.
- 15 La **Figura 4** proporciona un esquema del locus Sirpa de ratón de tipo silvestre antes (arriba) y después (abajo) de la activación de una secuencia de ácido nucleico que codifica Sirpa humanizada.
En la Figura 5, los paneles A y B, muestran la frecuencia de células eritroides humanas en ratones injertados con HSC. (Panel A) injerto de eritrocito CD235a⁺ humano en la médula ósea 6-8 semanas después del injerto de HSC en ratones Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-} Tpo^{h/h} Il3^{h/h} Gmcsf^{h/h} Mcsf^{h/h} ("ratón MITRG") que comprende las combinaciones indicadas de la EPO expresada a partir del locus EPO de ratón ("hEPO⁺") y/o SIRPa humana expresada como un integrante aleatorio en el genoma de ratón ("hSIRPa⁺"). (Panel B) Frecuencia de eritrocitos CD235a⁺ humanos en la sangre periférica en presencia frente a ausencia de hEPO 6-8 semanas después del injerto de HSC en ratones Rag2^{-/-} Il2rg^{nu/0} Tpo^{h/h} Mcsf^{h/h} Il3^{h/h} Gmcsf^{h/h} Epo^{h/h} SIRPa^{h/h} ("SupER-G") frente a ratones Rag2^{-/-} Il2rg^{nu/0} Tpo^{h/h} Il3^{h/h} Gmcsf^{h/h} Sirpa^{h/h} de control ("RGSKI-TI").
- 20 **En la Figura 6**, los paneles A y B, demuestran que el tratamiento con clodronato aumente la circulación de células eritroides humanas y reticulocitos en ratones injertados con HSC. Siete semanas después del injerto de HSC, se trataron ratones SupER-G con inyección retro-orbital diaria de 50 µl de liposoma de clodronato durante de tres a cinco días consecutivos. Se midió mediante FACS la frecuencia de células CD235⁺ humanas (eritrocitos y reticulocitos) (panel A) y células CD235⁺/CD71⁺ (reticulocitos) (panel B) en la sangre periférica. Panel B: tres ratones distintos después del tratamiento con clodronato.
- 25 **En la Figura 7**, Paneles A-C, ilustran cómo RVS humanos producidos a partir de ratones injertados son susceptibles de infección por *P. falciparum*. Se injertaron ratones SupER-G con hígado fetal o HSC adulto. Siete semanas después del injerto, se trataron ratones con inyección retro-orbital diaria de 50 µl de liposomas de clodronato durante de tres días consecutivos antes de la recogida de sangre. A continuación, se cocultivaron las muestras de sangre con RBC infectados con parásitos de etapa de sangre 3D7 de *P. falciparum* purificados (99 % de pureza). Se añadieron RBC humanos frescos en el cultivo 48 horas después de la infección y el cultivo de infección se mantuvo durante unos 10 días adicionales. Se llevo a cabo tinción Giemsa y PCR cuantitativa para cuantificar la parasitemia. RBC humanos de control: RBC humanos; RBC de ratón de control: RBC de ratones no injertados; RBC de ratón con adiciones de control: RBC de ratones no injertados con adiciones del 0,1 % de hRBC. En el (Panel A), rojo: Banda3 anti-humana; Azul: Hoechst. En el Panel C, los identificadores de leyendas enumerados de arriba a abajo se corresponden con el gráfico de barras del eje x de izquierda a derecha.
- 30 La **Figura 8** muestra la destrucción de RBC humanos en la sangre periférica de ratón en ausencia de clodronato. Se trataron ratones no injertados con clodronato o PBS. Para el tratamiento con clodronato, los ratones recibieron diariamente una inyección retro-orbital diaria de 50 µl de clodronato durante tres días consecutivos. Para el tratamiento con PBS, se suministraron solo 500 µl de PBS una hora antes de la transfusión de RBC humanos. Se transfundieron RBC humanos en ratones tratados previamente y se recogió la sangre periférica en los puntos de tiempo indicados. Se muestran las curvas de clodronato y PBS.

Descripción detallada

- 50 Se proporcionan roedores genéticamente modificados que expresan EPO humana a partir del genoma del roedor. También se desvelan en el presente documento métodos de realizar animales no humanos que expresan EPO a partir del genoma animal y métodos para usar animales no humanos que expresan EPO humana a partir del genoma animal. Estos animales y métodos pueden encontrar muchos usos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, en el modelado de eritropoyesis humana y función de eritrocitos; en el modelado de infección de patógenos humanos de eritrocitos; en cribas *in vivo* para agentes que modulan la función de la eritropoyesis y/o eritrocitos, por ejemplo, en un estado saludable o enfermo; en cribas *in vivo* para agentes que son tóxicos para los eritrocitos o progenitores de eritrocitos; en cribas *in vivo* para agentes que evitan, mitigan o revierten los efectos tóxicos de agentes tóxicos en eritrocitos o progenitores de eritrocitos; en cribas *in vivo* de eritrocitos o progenitores de eritrocitos de un individuo para predecir la capacidad de respuesta de un individuo a una terapia de enfermedad. Este y otros objetivos, ventajas y rasgos de la invención resultarán aparentes para los expertos en la técnica cuando lean los detalles de las composiciones y métodos como se describe en más detalle a continuación.

- 65 Antes de describir los métodos y composiciones actuales, debe entenderse que esta invención no se limita al método o composición particular descrita, ya que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares, y no

se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas. La presente invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, sino que se describe por las reivindicaciones concedidas.

5 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, al décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior del intervalo también se desvela específicamente. Cada intervalo inferior entre cualquier valor declarado o intermedio en el intervalo indicado está comprendido dentro de la invención. También queda englobado dentro de la invención que los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse, de forma independiente, o excluirse en el intervalo, y cada intercalo donde cualquier, ningún o ambos límites estén incluidos en los intervalos más pequeños. sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, también se incluyen en la invención los intervalos que excluyan uno cualquiera o ambos de los límites incluidos.

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

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

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

35 Las publicaciones descritas en el presente documento se proporcionan únicamente por su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. No debe interpretarse que nada en el presente documento constituya una admisión de que la presente invención no tenga derecho a anteponer dicha publicación por virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes a las fechas de publicación reales, lo que podría necesitar ser confirmado de manera independiente.

40 ANIMALES NO HUMANOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

En un aspecto de la invención, se proporcionan roedores que están genéticamente modificados para expresar una o más proteínas humanas a partir de su genoma. El roedor modificado genéticamente comprende en su genoma una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína EPO humana (hEPO). Por ejemplo, el roedor puede comprender en su genoma una secuencia de ácido nucleico que comprende EPO humana genómica y secuencia no codificante, por ejemplo, secuencia en el cromosoma 7, nucleótidos 100318423-100321323 o una fracción de la misma. Como alternativa, el roedor puede comprender en su genoma una secuencia de ácido nucleico que comprende segunda de ADNc de EPO humana (SEQ ID NO:3) o una fracción de la misma. El roedor se modifica genéticamente adicionalmente para expresar proteínas humanas adicionales a partir del genoma del roedor. Estas proteínas humanas adicionales son proteínas humanas que promueven el desarrollo y/función celular hematopoyética humana, concretamente, una proteína reguladora de la señal alfa (hSIRPa) (ID de Gen NCBI: 140885, los n.º de referencia de GenBank NM_080792.2, NM_001040022.1, NM_001040023.1), una proteína de interleucina humana 3 (hIL-3) (ID de Gen NCBI: 3562, n.º de referencia de GenBank NM 000588.3), una proteína de factor de estimulación de colonia humana 2 (granulocito-macrófago) (hGM-CSF) (ID de Gen NCBI: 1437, n.º de referencia de GenBank NM 000758.3), una proteína de factor de estimulación de colonia humana 1 (macrófago) (hM-CSF) (ID de Gen NCBI: 1435, n.º de referencia GenBank NM_000757.5, NM_172210.2, NM_172211.3, y NM_172212.2), una proteína de trombopoyetina humana (hTPO) (ID de Gen NCBI: 7066, n.º de referencia de GenBank NM 000460.3, NM_001177597.2, NM_001177598.2, NM_001289997.1, NM_001290003.1, NM_001290022.1, NM_001290026.1, NM_001290027.1, NM_001290027.1) y una proteína de interleucina 6 humana (hIL6) (ID de Gen NCBI: 3569, n.º de referencia de GenBank NM 000600.3).

60 El experto en la técnica apreciará que además de ácidos nucleicos y proteínas humanas "de tipo silvestre" y "nativas", los términos "un ácido nucleico humano" y una "proteína humana" engloban variantes de ácidos nucleicos y proteínas humanas de tipo silvestres también. Como se usa en el presente documento, el término "variante" define o bien un mutante genético de origen natural aislado de un polipéptido humano o secuencia de ácido o bien una variación recombinadamente preparada de un polipéptido humano o secuencia de ácido nucleico, cada uno de los cuales contiene una o más mutaciones comparadas con la secuencia de ácidos nucleicos o polipéptidos humana de

tipo silvestre correspondiente. Por ejemplo, tales mutaciones pueden ser una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos. El término "variante" también incluye homólogos y ortólogos humanos. En algunas realizaciones, un polipéptido de variante de la presente invención tiene el 70 % o más de identidad, por ejemplo, 75 %, 80 % u 85 % de identidad con respecto a un polipéptido humano de tipo silvestre, por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con respecto a un polipéptido humano de tipo silvestre.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse utilizando cualquier técnica conveniente en la técnica, por ejemplo, alineación de las secuencias usando, por ejemplo, software disponible públicamente. Las mutaciones se pueden introducir usando técnicas de biología molecular estándar, tales como mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis mediada por PCR, evolución dirigida y similares. Las personas especializadas en la técnica reconocerán que es posible introducir una o más mutaciones de aminoácido sin alterar la secuencia de aminoácidos, y que se pueden introducir una o más mutaciones de aminoácido sin alterar las propiedades funcionales de la proteína humana.

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

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

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

Además de proteínas humanas de "tipo silvestre" o "nativas" y "variantes de las mismas, el término "proteína humana", como se usa en el presente documento, por ejemplo, en el contexto de una "proteína EPO humana (hEPO)", una "proteína SIRPa humana (hSIRPa)", una "proteína IL-3 humana (hIL-3)", una "proteína GM-CSF humana (hGM-CSF)", una "proteína M-CSF humana (hM-CSF)", una "proteína TPO humana (hTPO)" y una "proteína IL-6 humana (hIL-6)", engloban proteínas de fusión, es decir, proteínas quiméricas, que incluyen uno o más fragmentos de una proteína humana de tipo silvestre (o variante de la misma) y que retiene una o más funciones, por ejemplo, una o más funciones de señalización y/o receptoras, de la proteína humana de tipo silvestre. Una proteína de fusión que incluye uno o más fragmentos de una proteína humana de tipo silvestre (o una variante de la misma), por ejemplo, en combinación con uno o más péptidos o polipéptidos no humanos, también se puede referir en el presente documento como una "proteína humanizada". Por lo tanto, por ejemplo, una proteína que incluye una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular de una proteína SIRPa humana de tipo silvestre fusionada con un dominio de señalización de una proteína SIRPa de ratón de tipo silvestre se engloba por el término "proteína SIRPa humana".

Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína humana es, por lo tanto, un polinucleótido que incluye una secuencia codificante para una proteína humana, por ejemplo, de una proteína humana de tipo silvestre, una variante de una proteína humana de tipo silvestre, un fragmento de una proteína humana de tipo silvestre (o variante de la misma) que retiene una o más funciones, por ejemplo, una o más funciones de señalización y/o receptoras, de la proteína humana de tipo silvestre o una proteína de fusión, por ejemplo, una proteína quimérica, que incluye uno o más fragmentos de una proteína humana de tipo silvestre (o variante de la misma) y que retiene una o más funciones, por ejemplo, una o más funciones de señalización y/o receptoras de la proteína humana de tipo silvestre.

Normalmente, en los animales genéticamente modificados de la presente divulgación, el ácido nucleico que codifica la proteína humana, por ejemplo, la proteína hEPO, la proteína hSIRPa, la proteína hIL-3, la proteína hGM-CSF, la

5 proteína hM-CSF, la proteína hTPO, la proteína hIL-6, etc. está unida operativamente a uno o más elementos reguladores de ADN. Elementos reguladores de ADN incluyen secuencias de control transcripcional y traslacional, tal como promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores y similares, que proporcionan y/o regulan la expresión de una secuencia codificante en una célula huésped. Por ejemplo, un "promotor" o "secuencia promotora" se refiere a una región reguladora de ADN capaz de unir ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante corriente abajo (dirección 3'). La secuencia promotora está unida en su extremo 3' por el sitio de iniciación de transcripción y se extiende corriente arriba (dirección 5') para incluir el mínimo número de bases o elementos necesario para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de iniciación de transcripción, así como dominios de unión de proteínas responsables de la unión de RNA polimerasa. Los promotores eucarióticos a menudo, pero no siempre, contendrán cajas "TATA" y cajas "CAT". Son de particular interés para la presente divulgación, los elementos reguladores de ADN, por ejemplo, promotores, que promueven la transcripción de la proteína humana en el mismo patrón de expresión espacial y temporal, es decir, en las mismas células y tejidos y a los mismos tiempos, como se observaría de la proteína endógena correspondiente.

15 La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína humana en el roedor sujeto está unida operativamente al promotor de roedor para al gen de roedor correspondiente. Por lo tanto, el ácido nucleico que codifica la proteína EPO humana está unida operativamente al promotor EPO de roedor endógeno.

20 La proteína humana se expresa a partir del locus del gen correspondiente en el roedor. En ciertos casos, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína humana sustituye la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de roedor correspondiente. Por lo tanto, por ejemplo, con respecto a roedores que expresan una proteína hEPO, la proteína hEPO se expresa a partir del locus EPO del genoma del roedor. En determinadas realizaciones, el roedor comprende una sustitución de secuencia de ácidos nucleicos que codifica EPO endógena con secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína hEPO.

30 En algunos casos, el roedor genéticamente modificado comprende una copia de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína humana. Por ejemplo, el roedor puede ser heterocigoto para la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína humana, es decir, se modifica genéticamente un alelo en un locus, mientras que el otro alelo es el alelo endógeno. En otros casos, el roedor genéticamente modificado comprende dos copias de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína humana. Por ejemplo, el roedor puede ser homocigoto para la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína humana, es decir, ambos alelos para un locus en el genoma diploide están genéticamente modificados para codificar la proteína humana, por ejemplo, ambos alelos comprenden una sustitución de secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína endógena con secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína humana. Por lo tanto, por ejemplo, con respecto a roedores que expresan una proteína hEPO, tal como se ha tratado anteriormente, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una hEPO puede integrarse en el locus EPO de roedor. En algunas de dichas realizaciones, el roedor modificado genéticamente es heterocigoto para la secuencia de ácidos nucleicos que codifica proteína hEPO, es decir, el roedor modificado genéticamente comprende un alelo que comprende el ácido nucleico que codifica hEPO y un alelo que codifica EPO endógena. En otras palabras, el animal es un roedor $EPO^{h/m}$, donde "h" representa el alelo que comprende la secuencia humana y "m" representa el alelo endógeno. En otras realizaciones de este tipo, el roedor modificado genéticamente es homocigoto para la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína hEPO, es decir, ambos alelos para un locus en el genoma diploide comprenderán la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína hEPO. En otras palabras, el roedor es un roedor $EPO^{h/h}$.

45 En algunos casos, el roedor también expresa la proteína de roedor correspondiente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína humana, por ejemplo, hEPO, puede ubicarse en el locus de gen de roedor correspondiente, por ejemplo, locus mEPO, en donde se integra en el locus de gen de roedor de un modo que permita la expresión continua de la secuencia codificante de roedor, por ejemplo, la secuencia codificante humana se inserta corriente arriba o corriente abajo de la secuencia codificante de roedor y se incluye una secuencia de péptido 2A o IRES entre las dos secuencias codificantes. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína humana, por ejemplo, hEPO, puede ubicarse en el locus de gen humano correspondiente, por ejemplo, locus mEPO, de un modo que interrumpa la expresión de la secuencia codificante humana, por ejemplo, como una sustitución en alguna o toda la secuencia codificante humana, pero el roedor se cría para que sea heterocigoto para la inserción, es decir, "activación", alelo, es decir, que porta un alelo de activación y un alelo de tipo silvestre. En otros casos, el roedor no expresa la proteína de animal no humano correspondiente. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína humana, por ejemplo, hEPO, puede ubicarse en el locus de gen de roedor correspondiente, por ejemplo, locus mEPO, de un modo que interrumpa la expresión de la secuencia de roedor, por ejemplo, como una sustitución en alguna o toda la secuencia codificante de roedor, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de roedor y el roedor es homocigoto para la inserción, es decir, "activación", alelo.

50 Cualquier roedor se puede modificar genéticamente de acuerdo con la divulgación del sujeto. En diversas realizaciones, el animal sujeto genéticamente modificado es un ratón o una rata.

65 El animal genéticamente modificado es un roedor. En una realización, el roedor se selecciona entre un ratón, una rata, y un hámster. En una realización, el roedor se selecciona de la superfamilia Muroidea. En una realización, el

animal genéticamente modificado es de una familia seleccionada entre Calomyscidae (por ejemplo, hámsteres similares a ratones), Cricetidae (por ejemplo, hámster, ratas y ratones del nuevo mundo, campañoles), Muridae (ratones y ratas auténticos, jerbos, ratones espinosos, ratas con cresta), Nesomyidae (ratones trepadores, ratones de abazón de las rocas, ratas coliblanco, ratas y ratones de Madagascar), Platanthomyidae (por ejemplo, lirón espinoso), y Spalacidae (por ejemplo, ratas topo, ratas del bambú, y zokores). En una realización específica, el roedor genéticamente modificado se selecciona entre un ratón o rata auténtico (familia Muridae), un jerbo, un ratón espinoso, y una rata con cresta.

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

En otra realización, el animal no humano genéticamente modificado es un ratón, por ejemplo, de una cepa de C57BL (por ejemplo, C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, C57BL/Ola, etc.); un ratón de la cepa 129 (por ejemplo, 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2); un ratón de la cepa BALB; por ejemplo, BALB/c. y similares. Véanse, por ejemplo, Festing et al. (1999) Mammalian Genome 10:836, véase también, Auerbach et al (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines). En una realización, el ratón modificado genéticamente es una mezcla de una cepa 129 anteriormente mencionada y una cepa C57BL/6 anteriormente mencionada. En otra realización, el ratón es una mezcla de las cepas 129 anteriormente mencionadas, o una mezcla de las cepas BL/6 anteriormente mencionadas. En otra realización más, el ratón es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa anteriormente mencionada.

El roedor sujeto genéticamente modificado también es inmunodeficiente. "Inmunodeficiente", incluye deficiencias en uno o más aspectos del sistema inmune nativo o endógeno del animal, por ejemplo, el animal es deficiente en uno o más tipos de células inmunes huésped funcionales, por ejemplo, deficiente en número y/o función de linfocitos B no humanos, número y/o función de linfocitos T no humanos y/o, número y/o función de células NK no humanas. etc.

Un método para conseguir inmunodeficiencia en animales es la irradiación subletal. Como alternativa, la inmunodeficiencia se puede conseguir mediante cualquiera de una cantidad de mutaciones genéticas conocidas en la técnica, cualquiera de los cuales se puede criar solo o en combinación en animales no humanos genéticamente modificados de la presente divulgación o que puede usarse como la fuente de células madre en las que se pueden introducir las modificaciones genéticas de la divulgación sujeto. Ejemplos no limitantes incluyen SCID unido a X, asociados con mutaciones de gen de IL2RG y caracterizados por el fenotipo de linfocitos T(-) B(+) NK(-); SCID recesiva autosómica asociada con mutaciones del gen Jak3 y caracterizada por el fenotipo de linfocitos T(-) B(+) NK(-); mutaciones del gen ADA caracterizadas por el fenotipo de linfocitos T(-) B(-) NK(-); mutaciones de cadena alfa de IL-7R caracterizada por el fenotipo de linfocitos T(-) B(+) NK(+); mutaciones de CD3 delta o épsilon caracterizadas por el fenotipo de linfocitos T(-) B(+) NK(+); mutaciones RAG1 y RAG2 caracterizadas por el fenotipo de linfocitos T(-) B(-) NK(+); mutaciones del gen Artemis caracterizadas por el fenotipo de linfocitos T(-) B(-) NK(+), mutaciones del gen CD45 caracterizadas por el fenotipo de linfocitos T(-) B(+) NK(+); y mutaciones de Prkdc^{scid} caracterizadas por el fenotipo de linfocitos T(-), B(-). Por tanto, en algunas realizaciones, el roedor genéticamente modificado inmunodeficiente tiene una o más deficiencias seleccionadas entre una deficiencia de cadena gamma del receptor de IL2 (Il2ry^{yl/-}), una deficiencia de Jak3, una deficiencia de ADA, una deficiencia de IL7R, una deficiencia de CD3, una deficiencia de RAG1 y/o RAG2, una deficiencia de Artemis, una deficiencia de CD45 y una deficiencia de Prkdc. Estos y otros modelos de inmunodeficiencia de animal serán conocidos por el experto en la técnica, cualquiera de los cuales puede usarse para generar animales inmunodeficientes de la presente divulgación.

En algunas realizaciones, roedores genéticamente modificados de acuerdo con la invención encuentran uso como receptores de células hematopoyéticas humanas que son capaces de desarrollar células inmunes humanas a partir de células hematopoyéticas humanas injertadas. Por tanto, en algunos aspectos de la invención, el roedor sujeto genéticamente modificado es un roedor inmunodeficiente genéticamente modificado que está injertado con células hematopoyéticas humanas.

Cualquier fuente de células hematopoyéticas humanas, células madre hematopoyéticas humanas (HSC) y/o células progenitoras madre hematopoyéticas (HSPC) tal como se conocen en la técnica o se describen en el presente documento pueden trasplantarse en los animales no humanos inmunodeficientes genéticamente modificados de la presente divulgación. Una fuente adecuada de células hematopoyéticas humanas conocida en la técnica son células sanguíneas de cordón umbilical, en particular células CD34-positivas (CD34). Otra fuente de células hematopoyéticas humanas es hígado fetal. Otra fuente es médula ósea humana. También se engloban células madre pluripotentes inducidas (iPSC) y células madre hematopoyéticas inducidas (iHSC) producidas por la desdiferenciación de células somáticas, por ejemplo, según los métodos conocidos en la técnica. Métodos para el trasplante de células humanas en animales no humanos se describen bien en la técnica y en otro apartado en el presente documento, cualquiera de los cuales se puede emplear por el experto en la técnica para llegar a los animales sujeto genéticamente modificados injertados.

- 5 Las células hematopoyéticas humanas trasplantadas dan lugar al animal no humano genéticamente modificado a una o más células humanas injertadas seleccionadas entre una célula CD34-positiv humana, una célula madre hematopoyética humana, una célula hematopoyética humana, una célula progenitora mieloide, una célula progenitora eritroide, una célula mieloide, una célula dendrítica, un monocito, un neutrófilo, una célula mastocito, un eritrocito y una combinación de los mismos. 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. En una realización específica, las células humanas comprenden células del linaje eritroide.
- 10 En algunas realizaciones, las células hematopoyéticas humanas trasplantadas dan lugar al roedor genéticamente modificado a un sistema hemato-linfoide humano injertado que comprende células progenitoras y madre hematopoyéticas humanas, células progenitoras mieloides, células mieloides humanas, célula dendríticas humanas, monocitos humanos, granulocitos humanos, neutrófilos humanos, células de mastocitos humanas, eritrocitos humanos, timocitos humanos, linfocitos T humanos, linfocitos B humanos y plaquetas humanas. En una realización,
- 15 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. En una realización específica, el sistema hemato-linfoide humano comprende células del linaje eritroide.
- 20 Las células del linaje eritroide incluyen eritrocitos y células que dan lugar a eritrocitos. "Eritrocitos" incluyen glóbulos rojos maduros, también denominados como células rojas o corpúsculos rojos. Células que dan lugar a eritrocitos incluyen células progenitoras de eritrocitos, es decir, células multipotentes proliferativas y precursores de eritrocitos, es decir, células proliferativas y no proliferativas comprometidas en convertirse en eritrocitos.
- 25 Los eritrocitos son el principal elemento celular de la sangre en circulación y el transporte de oxígeno como su función principal. El número de eritrocitos por milímetro cúbico de sangre se mantiene normalmente entre 4,5 y 5,5 millones en hombres y entre 4,2 y 4,8 millones en mujeres. Varía con la edad, actividad y condiciones medioambientales. Por ejemplo, un aumento a un nivel de 8 millones/mm³ se puede producir a por encima de 10.000 pies por encima del nivel del mar. Un eritrocito vive normalmente durante de 110 a 120 días, cuando se retira del corriente sanguíneo y se descompone por el sistema reticuloendotelial. Se producen nuevos eritrocitos a una tasa de ligeramente más del
- 30 1 % al día; de este modo, se mantiene normalmente un nivel constante. Una pérdida de sangre grave, anemia hemolítica o falta de oxígeno crónica pueden provocar que la producción de eritrocitos aumente en gran medida.
- 35 Los eritrocitos se originan de células madre hematopoyéticas en la médula de los huesos largos, desarrollándose en eritrocitos a través de sucesivas etapas celulares que incluyen células progenitoras mieloides comunes (CD123+, CD34+, c-kit +, Flt3+); células progenitoras megacarocito-eritroides (CD34+, CD38+, CD45RA-); proeritoblastos (también denominados pronormoblastos si son normales o promegaloblastos si son anormales; CD71+ grande, EpoR+, c-kit +, progenitores de Ter119+); eritoblastos basófilos (el citoplasma es basófilo, el núcleo es grande con cromatina grumosa y los nucleolos han desaparecido); eritoblastos policromáticos (también denominados un normoblasto intermediario, en el que la cromatina nuclear muestra un acoplamiento aumentado y el citoplasma
- 40 empieza a adquirir hemoglobina y toma un tinte acidófilo); normoblastos ortocromáticos (la etapa final antes de la pérdida nuclear en la que el núcleo es pequeño y finalmente se vuelve azul-negro, homogéneo, masa sin estructura); y reticulocitos (CD235+ en circulación, células CD71 +; la célula se caracteriza por un matrón tipo malla de hebras y partículas en el último sitio del núcleo).
- 45 Los eritrocitos maduros aparecen sobre un frotis periférico como discos bicóncavos, redondos u ovoides de aproximadamente 6-8 µm de diámetro. Contienen hemoglobina y tienen una zona de palor central debido a la biconcavidad de la célula y se pueden identificar fácilmente mediante citometría de flujo o métodos a base de inmunohistoquímica por la expresión elevada de los marcadores de superficie celular CD235 y CD59 con respecto a células no eritroides.
- 50 Tal como se demuestra en, por ejemplo, la FIG. 5, el Panel A y la FIG: 5, el Panel B de la presente divulgación, la expresión de hEPO bajo el control de un promotor de EPO desde el genoma de un animal no humano injertado de la presente divulgación aumenta el número de células humanas del linaje eritroide (CD235a+) en la médula ósea de promedio en aproximadamente 2 veces (por ejemplo, de aproximadamente el 11 % a aproximadamente el 22 %). La expresión de Sirpa humana potencia este efecto, dando como resultado un aumento de 3 veces o más de promedio (es decir, de aproximadamente el 11 % a aproximadamente el 33 %) en la representación de células CD235a+ humanas en la médula ósea en comparación con animales que no expresan ni EPO humana ni Sirpa humana (FIG. 5, Panel A). Por tanto, animales no humanos genéticamente modificados, inmunodeficientes, injertados que expresan hEPO de la presente divulgación encuentran su uso en el estudio de eritropoyesis humana y el desarrollo
- 60 de fármacos que modulan (por ejemplo, promueven o suprimen) la eritropoyesis humana.
- 65 Por otra parte, tal como se demuestra en, por ejemplo, FIG. 6, el tratamiento de clodronato de animales injertados con HSC humano que expresan hEPO aumenta en cien veces el número de células eritroides CD235+ (incluidos reticulocitos CD71+, la FIG. 6, Panel B) en la sangre periférica de estos animales, es decir, a aproximadamente el 1 % del total de glóbulos rojos en la periferia, en comparación con los controles sin tratar. De manera importante, tal como se demuestra en, por ejemplo FIG.7, glóbulos rojos humanos producidos a estos niveles de injerto en los

animales injertados con HSC que expresan EPO humana son susceptibles de infección con *P. falciparum*. Por tanto, animales no humanos genéticamente modificados que expresan hEPO como se describe en el presente documento encuentran uso particular en la generación de modelos animales de infección parasitarias que se dirigen a células humanas del linaje eritroide, por ejemplo, patógenos que resultan en malaria o enfermedades tipo malaria.

5 Por consiguiente, en algunos aspectos de la invención, el animal sujeto genéticamente modificado es un roedor injertado con células hematopoyéticas humanas y comprenden una infección por un patógeno humano. Son de particular interés en estas realizaciones patógenos humanos que se dirigen a células humanas del linaje eritroide. Ejemplos no limitantes de tales patógenos incluyen protozoos de los géneros *Plasmodium*, *Babesia*, *Theileria*, y similares. Como se describe con mayor detalle en lo sucesivo, el roedor sujeto genéticamente modificado injertado
10 con células hematopoyéticas humanas puede infectarse con patógeno humano usando cualquier método apropiado conocido en la técnica o que se describe en el presente documento para infectar animales con los patógenos de interés. Los roedores infectados de este modo mostrarán normalmente síntomas de parasitemia incluida morfología alterada por frotis de sangre teñida con Glemsa, y disminución grave (por ejemplo, 50 %) en la concentración de eritrocitos total y anemia.

15

MÉTODOS DE REALIZACIÓN DEL RATÓN SUJETO GENÉTICAMENTE MODIFICADO

En el presente documento se desvelan métodos para realizar los animales no humanos de la presente divulgación. En la prácticas de los métodos divulgados, se genera un animal no humano que comprende una secuencia de
20 ácidos nucleicos que codifica una proteína hEPO unida operativamente a un promotor de EPO, por ejemplo, el promotor EPO de animal no humano, por ejemplo, en el locus EPO del genoma del animal no humano.

La generación de un animal no humano que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína hEPO unida operativamente a un promotor EPO puede conseguirse usando cualquier método conveniente para la
25 realización de animales genéticamente modificados, por ejemplo, como se conoce en la técnica o como se describe en el presente documento.

Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la proteína hEPO puede incorporarse en un vector recombinante en una forma adecuada para la inserción en el genoma de la célula huésped y expresión de la proteína humana en una
30 célula huésped no humana. En diversas realizaciones, el vector recombinante incluye una o más secuencias reguladoras unidas operativamente al ácido nucleico que codifica la proteína humana e un modo que permite la transcripción del ácido nucleico en ARNm y la translación del ARNm en la proteína humana, tal como se ha descrito anteriormente. se entenderá que el diseño del vector puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transfectar y/o la cantidad de proteína humana deseada a expresar.

35

Cualquiera de los diversos métodos puede entonces usarse para introducir la secuencia de ácidos nucleicos humana en una célula de animal para producir un animal genéticamente modificado que exprese el gen humano. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica e incluyen, pero sin limitación, microinyección pronuclear, transformación de células madre embrionarias, recombinación homóloga y técnicas de activación de genes. Los métodos para
40 generar animales genéticamente modificados que se pueden utilizar incluyen, pero sin limitación, los descritos en Sundberg and Ichiki (2006, Genetically Engineered Mice Handbook, CRC Press), Hofker and van Deursen (2002, Genetically modified Mouse Methods and Protocols, Humana Press), Joyner (2000, Gene Targeting: A Practical Approach, Oxford University Press), Turksen (2002, Embryonic stem cells: Methods and Protocols in Methods Mol Biol., Humana Press), Meyer et al. (2010, Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos 107:15022-15026) y Gibson (2004, A Primer Of Genome Science 2a ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer), Patente de EE.UU n.º 6.586.251, Rathinam et al. (2011, Blood 118:3119-28), Willinger et al., (2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108:2390-2395), Rongvaux et al., (2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108:2378-83) y Valenzuela et al. (2003, Nat Biot 21:652-659).

45

Por ejemplo, Por ejemplo, se pueden crear animales sujeto genéticamente modificados introduciendo el ácido nucleico que codifica la proteína humana en un oocito, por ejemplo, por microinyección y permitiendo que se
50 desarrolle el oocito en el animal de acogida hembra. En las realizaciones preferidas, se injerta la expresión en los oocitos fertilizados. Se pueden recoger los oocitos fertilizados desde hembras superovuladas el día después del apareamiento e inyectar la construcción de expresión. Los oocitos inyectados o bien se cultivan durante toda la noche o bien se transfieren directamente a los oviductos de hembras pseudo preñadas p.c. de 0,5 días. Los métodos
55 para la superovulación, recogida de oocitos, inyección de la construcción de expresión y transferencia al embrión son conocidos en la técnica y se describen en Manipulating the Mouse Embryo (2002, A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Se puede evaluar el vástago en cuanto a la presencia del ácido nucleico introducido por análisis de ADN (por ejemplo, PCR, transferencia de Southern, secuenciación de ADN, etc.) o mediante análisis de proteínas (por ejemplo, ELISA, transferencia Western, etc.).

60

Como otro ejemplo, se puede transfectar la construcción que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína humana en células madre (células ES o células iPS) utilizando métodos muy conocidos, tales como electroporación, precipitación con fosfato de calcio, lipofección, Se pueden evaluar las células en cuanto a la presencia del ácido
65 nucleico introducido por análisis de ADN (por ejemplo, PCR, transferencia de Southern, secuenciación de ADN, etc.) o mediante análisis de proteínas (por ejemplo, ELISA, transferencia Western, etc.). Las células que según se ha determinado han incorporado la construcción de expresión se pueden introducir en embriones de pre-implantación.

- Para una descripción más detallada de los métodos conocidos en las técnicas útiles para las composiciones y métodos de la invención, véase, Nagy et al., (2002, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Nagy et al. (1990, Development 110:815-821), la Patente de EE.UU n.º 7.576.259, la Patente de EE.UU n.º 7.659.442, Patente de EE.UU n.º 7.294.754, y Kraus et al. (2010, Genesis 48:394-399).
- Adicionalmente, como se describe en algunos de los Ejemplos más adelante, se puede construir una construcción de ácido nucleico utilizando tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6): 652-59 and U.S. Patent No. 6.586.251), introducida en células madre (por ejemplo, células ES) y se determinaron clones correctamente dirigidos usando ensayos de pérdida de alelo y ganancia de alelo (Valenzuela et al., anterior); se pueden usar células ES correctamente dirigidas como células ES donadoras para su introducción en un embrión de ratón en la fase de 8 células mediante el uso del método de VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. n.º 7.294.754 y Poueymirou et al. 2007, F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor genotargeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1):91-99).
- Se pueden criar animales fundadores genéticamente modificados para animales adicionales que portan la modificación genética. Los animales genéticamente modificados que portan un ácido nucleico que codifica proteína(s) humana(s) de la presente divulgación pueden criarse adicionalmente a otros animales genéticamente modificados que portan otras modificaciones genéticas, por ejemplo, ratones de activación de hSIRPa, ratones de activación de hIL-3, ratones de activación de hGM-CSF, ratones de activación de hM-CSF, ratones de activación de hTPO, ratones de activación de hIL-6 y similares o pueden criarse para animales desactivados, por ejemplo, un animal no humano que es deficiente de una o más proteínas, por ejemplo, no expresa uno o más de sus genes, por ejemplo, animal deficiente de Rag2, un animal deficiente de Il2rg.
- En otra realización, células madre, por ejemplo, células ES, se pueden generar de modo que comprenden varias modificaciones genéticas, por ejemplo, humanizaciones o deleciones génicas descritas en el presente documento y tales células madre se pueden introducir en un embrión para generar animales genéticamente modificados con varias modificaciones genéticas.
- El roedor sujeto genéticamente modificado es inmunodeficiente. Animales no humanos genéticamente modificados que son inmunodeficientes y que comprenden una o más proteínas humanas, por ejemplo, hEPO, hSIRPa, hIL-3, hGM-CSF, hM-CSF y/o hTPO, se pueden generar usando cualquier método conveniente para la generación de animales genéticamente modificados, por ejemplo, como se conoce en la técnica o como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la generación del animal inmunodeficiente genéticamente modificado puede lograrse mediante la introducción del ácido nucleico que codifica la proteína humana en un oocito o células madre que comprenden un alelo de gen SCID mutante que, cuando es homocigoto, resultará en inmunodeficiencia tal como se ha descrito en mayor detalle anteriormente y en los ejemplos prácticos en el presente documento. Se generan ratones con el oocito modificado o células ES usando, por ejemplo, métodos descritos en el presente documento conocidos en la técnica y se emparejan para producir los ratones inmunodeficientes que comprenden la modificación genética deseada. Como otro ejemplo, se pueden generar animales no humanos genéticamente modificado en un fondo inmunocompetente y cruzarse con un animal que comprende un alelo de gen mutante que, cuando es hemocigoto u homocigoto, resultará en inmunodeficiente y la progenie emparejada para crear un animal inmunodeficiente que expresa al menos una proteína humana de interés.
- En algunas realizaciones, el ratón genéticamente modificado se trata para eliminar células hematopoyéticas endógenas que pueden existir en el ratón. En una realización, el tratamiento comprende irradiar el ratón genéticamente modificado. En una realización específica, crías de ratón recién nacidas genéticamente modificadas se irradian subletalmente. En una realización específica, crías recién nacidas se irradian 2 x 200 cGy con un intervalo de cuatro horas.
- Diversas realizaciones de la invención proporcionan animales genéticamente modificados que incluyen ácido nucleico de ser humano en sustancialmente todas sus células, así como animales genéticamente modificados que incluyen un ácido nucleico de ser humano en algunas, pero no todas, sus células. En algunos casos, por ejemplo, recombinación dirigida, una copia del ácido nucleico de ser humano se integrará en el genoma de los animales genéticamente modificados. En otros casos, por ejemplo, integración aleatoria, múltiples copias, adyacentes o distantes entre sí, del ácido nucleico de ser humano se puede integrar en el genoma de los animales genéticamente modificados.
- Por lo tanto, en algunas realizaciones, el roedor sujeto genéticamente modificado puede ser un animal inmunodeficiente que comprende un genoma que incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido unido operativamente al promotor del animal no humano correspondiente, en donde el animal expresa el polipéptido humano codificado. En otras palabras, el roedor sujeto inmunodeficiente genéticamente modificado comprende un genoma que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido humano, en donde el ácido nucleico está unido operativamente al promotor no humano correspondiente y una señal de poliadenilación y en donde el roedor expresa el polipéptido humano codificado.

Como se ha analizado anteriormente, en algunas realizaciones, el roedor sujeto genéticamente modificado se injerta con células hematopoyéticas humanas. Cualquier fuente de células hematopoyéticas humanas, células madre hematopoyéticas humanas (HSC) y/o células progenitoras madre hematopoyéticas (HSPC) tal como se conocen en la técnica o se describen en el presente documento pueden trasplantarse en los animales no humanos genéticamente modificados de la presente divulgación, por ejemplo, sangre de cordón umbilical, hígado fetal, médula ósea, iPSC, etc. En una realización, las células hematopoyéticas se seleccionan de glóbulos rojos de cordón umbilical y células de hígado fetal humano. La cantidad de células a trasplantar se entenderá bien por un experto en la técnica o se determinará empíricamente. En una realización, el injerto es de aproximadamente $1-2 \times 10^5$ células CD34+ humanas. Las células se pueden trasplantar en el animal no humano sujeto huésped utilizando cualquier técnica conveniente conocida en la técnica, por ejemplo, inyección en la vena caudal, inyección retro-orbital, inyección en hígado neonatal y similares. Las células se pueden trasplantar en el huésped en cualquier solución tamponada conveniente, por ejemplo, PBS, medio modificado por Dulbecco, medio modificado por Iscove y similares. En algunos casos, el animal puede irradiarse antes de ser injertado, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, para mejorar la inmunodeficiencia.

Las células hematopoyéticas humanas injertadas de este modo dan lugar a una o más células humanas a partir 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, una célula mastocito, un timocito, un linfocito T, un linfocito B, una plaqueta, un eritrocito y una combinación de los mismos. 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. Se puede realizar cualquier número de ensayos para confirmar que el injerto es exitoso, que incluye, por ejemplo, ensayos de citometría de flujo para las diversas células hematopoyéticas humanas de interés, frotis de sangre e inmunohistoquímica.

Como se ha analizado anteriormente, en algunas realizaciones, el roedor sujeto genéticamente modificado injertado con células hematopoyéticas humanas está infectado con un patógeno humano. Son de particular interés en estas realizaciones patógenos humanos que se dirigen a células humanas del linaje eritroide. Ejemplos no limitantes de tales patógenos incluyen protozoos de los géneros de especie *Plasmodium*, especie *Babesia*, especie *Theileria*, y similares. En algunas realizaciones, la cepa de patógeno usada es una cepa de origen natural. En determinadas realizaciones, la cepa usada se ha seleccionado in vivo para su competencia para cultivar reproducibilidad en ratones inmunodeficientes injertados con eritrocitos humanos, por ejemplo, cepas de *P. falciparum* Pf3D7^{0087/N9} o Pf3D7^{0087/N5}.

Los animales sujeto inmunodeficientes injertados puede infectarse usando cualquier método conocido en la técnica para infectar animales con patógeno que se dirige a células del linaje eritroide. Por ejemplo, los animales sujeto injertados inmunodeficientes pueden inocularse intraperitonealmente con glóbulos rojos con parásitos (PRBC). Véanse, por ejemplo, Badell et al. (2000) Human malaria in immunocompromised mice: an *in vivo* model to study defense mechanisms against *Plasmodium falciparum*. JEM 192(11): 1653-1660; and Moreno et al. (2006) The course of infections and pathology in immunomodulated NOD/ItSz-SCID mice inoculated with *Plasmodium falciparum* laboratory lines and clinical isolates. Int. J. Parasitol. 36: 361-369. Como otro ejemplo, los animales sujeto injertados inmunodeficientes pueden inocularse intravascularmente con glóbulos rojos con parásitos. Véanse, por ejemplo, Angulo-Barturen et al. (2008) A murine model of falciparum-malaria by *in vivo* selection of competent strains in non-myelodepleted mice engrafted with human erythrocytes. PLoS One 3:e2252; y Jimenez-Diaz et al. (2009) Improved murine model of malaria using *Plasmodium falciparum* competent strains and non-myelodepleted NOD-scid IL2Rg^{fluo} mice engrafted with human erythrocytes. Antimicrob Agents Chemother 53:4533-4536. En algunas realizaciones, la infección se produce inyectando el parásito en el animal no humano, es decir, no en el contexto de células eritroides. En algunas realizaciones, los animales sujeto injertados inmunodeficientes se empobrecen químicamente *in vivo* de células fagocíticas antes de y/o durante la invención. En dichas realizaciones, cualquier agente quimioterapéutica que empobrezca selectivamente células fagocíticas huésped se puede administrar a los animales sujeto, que incluye, por ejemplo, clodronato, por ejemplo, como se describe en los ejemplos prácticos del presente documento; difosfonato de diclorometileno, por ejemplo, tal como se describe en Badell et al. anteriormente, y Moreno et al. anteriormente; anticuerpo monoclonal específico para neutrófilos polimorfonucleares, por ejemplo NIMP-R14, tal como se describe en Badell et al. anteriormente, y Moreno et al., *citado anteriormente*; y similares.

El porcentaje de parasitemia en los animales no humanos genéticamente modificados infectados de la presente divulgación se puede estimar mediante cualquier método conveniente en la técnica, por ejemplo, microscópicamente a partir de un frotis de sangre teñida con Giemsa, por ejemplo, 3 días después de la inyección; o mediante citometría de flujo, por ejemplo, mediante medición de la emisión del tinte del ácido nucleico YOYO-1 o del tinte permanente celular SYTO-16, por ejemplo en presencia o ausencia de mA b TER-119. Véanse, por ejemplo, Jimenez-Diaz et al. Quantitative measurement of *Plasmodium*-infected erythrocytes in murine models of malaria by flow cytometry using bidimensional assessment of SYTO-16 fluorescence. Cytometry A 2009, 75:225-235.

USO DEL RATÓN SUJETO GENÉTICAMENTE MODIFICADO

La capacidad de estudiar tejido humano en un entorno *in vivo* en ratones ha abierto el intervalo de posibles caminos de investigación. Grandes limitaciones han impedido la aplicación del enfoque y de estas una de las mayores

deficiencias ha sido la incapacidad de los factores de ratón en soportar células humanas. De hecho, en el sistema inmunitario, muchos factores esenciales necesarios para el desarrollo y función de células inmunes humanas son específicos de especie y no se pueden proporcionar eficazmente por el ratón. Por lo tanto, se decidió seguir una estrategia de sustitución de los genes de ratón con sus homólogos humanos, permitiendo un mejor desarrollo y función de células humanas e inactivando potencialmente lo mismo de las células de ratón correspondientes. Mediante la aplicación de este concepto a EPO de citoquinas humanas, se muestra en el presente documento que la sustitución de secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína EPO de ratón con secuencia de ácidos nucleicos que codifica proteína de EPO humana mejora el desarrollo y función de células del linaje eritroide en el sistema inmunitario humano injertado en ratones.

Por ejemplo, los ejemplos prácticos en, por ejemplo, FIG. 5, demuestran que la expresión de hEPO a partir de una secuencia de ácidos nucleicos bajo el control de un promotor de EPO en el genoma de un animal no humano disminuye el número de células humanas del linaje eritroide (CD235a+) que se desarrollan en la médula ósea de animales injertados con HSC humano en aproximadamente 2 veces (es decir, de aproximadamente el 11 % a aproximadamente el 22 %). La expresión de Sirpa humana potencia este efecto, dando como resultado un aumento total de 3 veces (es decir, de aproximadamente el 11 % a aproximadamente el 33 %) en la representación de células CD235a+ humanas en la médula ósea en comparación con animales que no expresan ni EPO humana ni Sirpa humana (Figura 4a). Por otra parte, tal como se demuestra en, por ejemplo, FIG. 6, el tratamiento de clodronato de animales injertados con HSC humano que expresan EPO humana aumenta en cien veces el número de células eritroides CD235+ (incluidos reticulocitos CD71+, la FIG. 6, Panel B) en la sangre periférica de estos animales, es decir, a aproximadamente el 1 % del total de glóbulos rojos, sobre controles sin tratar. De manera importante, tal como se demuestra en, por ejemplo, FIG. 7, glóbulos rojos humanos producidos a estos niveles de injerto en los animales injertados con HSC que expresan EPO humana son susceptibles de infección con especie de *Plasmodium* sp. tal como *P. falciparum*. Por consiguiente, animales no humanos genéticamente modificados que expresan EPO humana tal como se describen en el presente documento encuentran uso particular en la generación de animales que son susceptibles de infección con especie *Plasmodium* o que soportarán mejor eritrocitos humanos que están plenamente injertados en el animal antes de su infección en modelos de roedor actuales.

Por tanto, los animales no humanos genéticamente modificados de la presente divulgación encuentran muchos usos en la técnica. Por ejemplo, los animales injertados genéticamente modificados de la presente divulgación son útiles para estudiar la eritropoyesis humana y la función de los eritrocitos humanos. Como otro ejemplo, los ratones injertados genéticamente modificados de la presente divulgación proporcionan un sistema útil para cribar agentes candidato para actividades deseadas *in vivo*, por ejemplo, para identificar agentes que son capaces de modular (es decir, promover o suprimir) eritropoyesis humana y/o la función de eritrocitos humanos, por ejemplo, en un estado saludable o enfermo, por ejemplo, como células cancerosas, durante la infección de patógenos, etc., por ejemplo, para identificar terapéuticos novedosos; o como otro ejemplo, para identificar agentes que son tóxicos para células humanas del linaje eritroide y para identificar agentes que eviten, mitiguen o inviertan los efectos tóxicos de agentes tóxicos en células humanas del linaje eritroide; etc. Como otro ejemplo adicional, los animales injertados modificados genéticamente de la presente divulgación proporcionan un sistema útil para predecir la capacidad de respuesta de un individuo a una terapia de enfermedad, por ejemplo, proporcionando una plataforma *in vivo* para cribar la capacidad de respuesta del sistema inmune de un individuo a un agente, por ejemplo, un agente terapéutico, para predecir la capacidad de respuesta de un individuo a ese agente.

Como un ejemplo no limitante, los ratones injertados genéticamente modificados de la presente divulgación encuentran uso en la generación de modelos de ratón de infección de patógenos por parásitos que se dirigen a células eritroides humanas, por ejemplo, *Plasmodium*, *Babesia*, *Theileria* y similares. Dichos modelos de infección de ratón serán útiles tanto en la investigación, por ejemplo, para comprender mejor la progresión de infección en seres humanos como en el descubrimiento de fármacos, por ejemplo, para identificar agentes candidatos que protegen o tratan la infección por tales parásitos.

Los protozoos del género *Plasmodium* son la causa de malaria en seres humanos. La malaria empieza con una picadura de un mosquito anófeles infectado, que introduce el protozoo a través de su saliva en el sistema circulatorio y, finalmente al hígado donde madura y se reproduce. El protozoo, entonces, entra en el torrente sanguíneo e infecta células del linaje eritroide en diversas etapas de maduración.

Cinco especies de *Plasmodium* pueden infectar y transmitirse por los humanos. La vasta mayoría de fallecimientos son causados por *P. falciparum*, mientras que *P. vivax*, *P. ovale*, y *P. malariae* provoan una forma más suave de malaria que raramente es mortal. Esto se cree que se deben, en parte, a los tipo(s) de células dirigidas por cada especie: *P. falciparum* crece en glóbulos rojos (RBC) de todas las maduraciones, mientras que, por ejemplo, *P. vivax* se limita al crecimiento en reticulocitos, que representan solo aproximadamente el 1 % - 2 % de RBC en total en la periferia. Además, *P. falciparum* provoca malaria grave mediante una propiedad distintiva no compartida por ninguna otra malaria humana, concretamente, la de la secuestración. A las 48 horas del ciclo de etapa en sangre asexual, las formas maduras cambian las propiedades de la superficie de glóbulos rojos infectados, haciendo que se peguen a los vasos sanguíneos (un proceso denominado citoaderencia). Esto conduce a la obstrucción de la microcirculación y da como resultado la disfunción de múltiples órganos.

Los síntomas de la malaria incluyen fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, sudores, fatiga, anemia, náuseas, tos seca (no productiva), dolor muscular y/o de espalda y un bazo dilatado. Otros síntomas y complicaciones asociadas con la malaria incluyen infección cerebral (cerebritis), anemia hemolítica, insuficiencia renal, fallo hepático, meningitis, edema pulmonar y hemorragia del bazo. En general, un individuo en riesgo de desarrollar malaria empezará a mostrar sus síntomas 7 días o más después de su infección, por ejemplo, de 9 a 14 días después de la infección inicial por *P. falciparum*, de 12 a 18 días después de la infección inicial por *P. vivax* o *P. ovale*, de 18 a 40 días después de la infección inicial por *P. malariae*, o de 11 a 12 días después de la infección inicial por *P. knowlesi*. Agentes antimalaria usados en la técnica para tratar o prevenir malaria incluyen cloroquina, quinidina, doxiciclina, tetraciclina, clindamicina, atovaquona más proguanil (Malarona), Mefloquina, artesunato y pirimetamina más sulfadoxina (Fansidar).

Los métodos para determinar si un sujeto ha sido infectado con *Plasmodium* son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, examen microscópico de sangre usando películas sanguíneas, con tests de diagnóstico rápido (RDT) a base de antígenos, por ejemplo, RDT a base de inmunocromatografía, por detección de ADN de parásito mediante reacción de cadena de la polimerasa (PCR), etc. Se puede usar cualquier método conveniente para determinar si los glóbulos rojos de ser humanos del sujeto se han infectado con el patógeno.

Otro ejemplo de patógenos de interés son protozoos del género *Babesia*. La infección por *Babesia* da como resultado una enfermedad tipo malaria denominada babesiosis. La babesiosis es una enfermedad tipo vector transmitida normalmente por garrapatas *Ixodes scapularis*. La enfermedad se causa normalmente por *B. microti* en humanos, *B. canis rossii* y *B. canis canis* en perros, *B. bovis* en vacas y *B. bigemina* en ganado. *Babesia microti*, que infecta a seres humanos, usa el mismo vector de garrapata que la enfermedad de Lyme y la erliquiosis y puede producirse junto con estas otras enfermedades. Los protozoos también se pueden transmitir por transfusión sanguínea.

En los seres humanos, la babesiosis puede ser asintomática o caracterizarse por síntomas que varían de fiebre leve y diarrea a una fiebre alta, escalofrío y anemia grave. En los casos graves, se puede producir insuficiencia orgánica, incluido síndrome de dificultad respiratoria aguda. La mayoría de casos graves se produce en gente que ha sufrido una esplenectomía o personas con una inmunodeficiencia, tal como pacientes con VIH/SIDA. El tratamiento comprende normalmente un régimen de dos fármacos de quinina y clindamicina o de atovaquona y azitromicina. En casos en los que la babesiosis parece ser letal, se realiza una transfusión de intercambio de sangre, en la que se retiran los glóbulos rojos y se reemplazan por no infectados.

El diagnóstico definitivo de infección por *Babesia* es mediante la identificación del parásito en un frotis de sangre fina teñida con Giemsa. El parásito aparece en eritrocitos como merozoitos emparejados que forman la "formación cruzada de maltesa" en humanos o "dos peras que se sostienen juntas" en animales. Otros métodos diagnósticos incluyen PCR de sangre periférica y ensayo serológico de anticuerpos (IgG, IgM) frente a *Babesia*.

Otra enfermedad tipo malaria, la teileriosis, es provocada por protozoos del género *Theileria*. En los seres humanos, la teileriosis es causada por *T. microti*; en caballos, por *T. equi* ("Piroplasmosis equina"); en ovejas y cabras, por *T. lestoquardi*; en ganado, búfalo africano, búfalo de agua y antílopes de agua, por *T. annulata* ("Teileriosis Tropical", también conocida como "Teileriosis mediterránea" o *T. parva* ("Fiebre de la costa Este", también conocida como "Enfermedad corredor"). La teileriosis se transmite al huésped mediante diversas especies de garrapata entre las que se incluye *Ixodes scapularis*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, y *Hyalomma*. El organismo se reproduce en la garrapata según progresa a través de su fase de vida y madura y entra en la saliva después de que la garrapata se une al huésped. Normalmente, la garrapata debe unirse durante unos pocos días antes de que se vuelve ineficaz. Sin embargo, si las temperaturas medioambientales son altas, se pueden desarrollar esporozoitos ineficaces en garrapatas en el suelo y pueden entrar en el huésped a las horas después de su unión.

La teileriosis en seres humanos se presenta normalmente como fiebre y hemólisis. El diagnóstico definitivo de infección por *Theileria* es mediante la identificación del parásito en un frotis de sangre fina teñida con Giemsa.

Los roedores injertados genéticamente modificados de la presente divulgación encuentran su uso en el cribado de agentes candidatos para identificar aquellos que prevendrán (por ejemplo, vacunas) o tratarán infecciones por *Plasmodium*, *Babesia*, *Theileria* y otros parásitos que se dirigen a los eritrocitos humanos. Los términos "tratamiento", "tratar" y similares se usan en este documento para incluir en líneas generales la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en lo referente a prevenir completa o parcialmente una enfermedad o un síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en lo referente a una cura parcial o completa para una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se usa en este documento, incluye cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, que incluyen: (a) prevenir que se produzca la enfermedad en un sujeto que pueda tener predisposición a la enfermedad, pero al que aún no se le haya diagnosticado; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad. Entre los agentes candidato de interés como agentes terapéuticos antiparasitarios se incluyen los que se pueden administrar antes, durante o después de la infección con el parásito y que, cuando se administran en una cantidad eficaz, inhiben los efectos del parásito en un individuo (es decir, el huésped), por ejemplo, destruyendo el parásito o célula infectada por el parásito, evitando la propagación del

parásito, evitando la producción o acción de un agente producido por el parásito que es tóxico para el individuo (es decir, una toxina), etc. Los términos "individuo", "sujeto", "huésped", y "paciente", se usan indistintamente en el presente documento e incluyen cualquier mamífero sujeto del cual se desee el diagnóstico, tratamiento o terapia, en particular seres humanos.

5 En ensayos de cribado para agentes biológicamente activos, un animal no humano genéticamente modificado injertado con células hematopoyéticas humanas de la presente divulgación, por ejemplo, un ratón Rag2^{-/-} Il2rg^{null}Epo^{h/m} injertado, un ratón Rag2^{-/-} Il2rg^{null}Tpo^{h/h}Il3/Gmcsf^{h/h}Epo^{h/m}SIRPα^{h/h} ("TIES") injertado, un ratón Rag2^{-/-} Il2rg^{y/-}Tpo^{h/h}Mcsf^{h/h}Il3^{h/h}Gmcsf^{h/h}Epo^{h/h}SIRPα+ ("MISTER-G") injertado, un ratón Rag2^{-/-} Il2rg^{null}Tpo^{h/h}Mcsf^{h/h}Il3/Gmcsf^{h/h}Epo^{h/h}SIRPα-tg+ ("SupER-G") injertado, etc. se pone en contacto con un agente candidato de interés y se evalúa el efecto del agente candidato mediante el control de uno o más parámetros de salida. Estos parámetros de salida pueden reflejar la viabilidad de las células, por ejemplo, el número total de células hematopoyéticas o el número de células de un tipo de células hematopoyéticas particular, o del estado apoptótico de las células, por ejemplo, la cantidad de fragmentación del ADN, la cantidad de zeiosis celular, la cantidad de fosfatidilserina en la superficie de la célula y similares mediante métodos que son bien conocidos en la técnica. Como alternativa o de manera adicional, estos parámetros de salida pueden reflejar la capacidad de diferenciación de las células, por ejemplo, las proporciones de células diferenciadas y tipos de células diferenciadas. Como alternativa o de manera adicional, estos parámetros de salida pueden reflejar la función de las células, por ejemplo, las citoquinas y quimioquinas producidas por las células, los anticuerpos (por ejemplo, cantidad o tipo) producido por las células, la capacidad de las células para llegar a casa y extravasarse a un sitio de desafío, la capacidad de las células para modular, es decir, promover o suprimir, la actividad de otras células *in vitro* o *in vivo*, la capacidad de absorber hemoglobina, etc. Otros parámetros pueden reflejar el efecto del agente de infección, por ejemplo, infección de patógenos en el animal, por ejemplo, el título de patógeno en el ratón, etc., como relevante para los estudios que se llevan a cabo.

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

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

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

60 Los agentes candidatos de interés para el cribado también incluyen ácidos nucleicos, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican ARNip, ARNhc, moléculas antisentido o ARNmi o ácidos nucleicos que codifican polipéptidos. Se encuentran disponibles muchos vectores útiles para transferir ácidos nucleicos a células diana. Los vectores pueden mantenerse episomalmente, por ejemplo, como plásmidos, ADN de minicírculos, vectores derivados de virus tales como citomegalovirus, adenovirus, etc. o pueden estar integrados en el genoma de la célula diana, a través de recombinación homóloga o integración aleatoria, *por ejemplo*, vectores derivados de retrovirus tales como MMLV, HIV-1, ALV, etc. Los vectores se pueden proporcionar directamente a las células sujeto. En otras palabras, las

células pluripotentes se ponen en contacto con vectores que comprenden el ácido nucleico de interés de manera que los vectores son captados por las células.

5 Los métodos para poner en contacto las células, por ejemplo, células en cultivo o células en un ratón, con vectores de ácidos nucleicos, tales como electroporación, transfección con cloruro de calcio y lipofección, son bien conocidos en la técnica. Como alternativa, el ácido nucleico de interés puede proporcionarse a las células a través de un virus. En otras palabras, las células se ponen en contacto con partículas virales que comprenden el ácido nucleico de interés. Los retrovirus, por ejemplo, lentivirus, son particularmente adecuados para el método de la invención. Los vectores retrovirales utilizados comúnmente son "defectuosos", es decir, incapaces de producir proteínas virales requeridas para una infección productiva. Más bien, la replicación del vector requiere crecimiento en una línea celular de empaquetamiento. Para generar partículas víricas que comprenden ácidos nucleicos de interés, los ácidos nucleicos retrovirales que comprenden el ácido nucleico se empaquetan en cápsidas virales mediante una línea celular de empaquetamiento. Las diferentes líneas celulares de empaquetamiento proporcionan una proteína de envoltura diferente para ser incorporada en la cápsida, esta proteína de envoltura determina la especificidad de la partícula viral para las células. Las proteínas de envoltura son de al menos tres tipos, ecotrópicas, anfotrópicas y xenotrópicas. Los retrovirus empaquetados con proteína de envoltura ecotrópica, por ejemplo, MMLV, son capaces de infectar la mayoría de los tipos de células murinas y de rata, y se generan mediante la utilización de líneas celulares de empaquetamiento ecotrópico como BOSC23 (Pear et al. (1993) P.N.A.S. 90: 8392-8396). Los retrovirus que llevan proteína de envoltura anfotrópica, por ejemplo, 4070A (Danos *et al.*, anterior), son capaces de infectar la mayoría de los tipos celulares de mamíferos, incluyendo seres humanos, perros, y ratones, y se generan mediante la utilización de líneas celulares de empaquetamiento anfotrópico tales como PA12 (Miller et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317 (Miller et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902); GRIP (Danos *et al.* (1988) PNAS 85:6460-6464). Los retrovirus empaquetados con proteína de envoltura xenotrópica, *por ejemplo*, AKR env, son capaces de infectar la mayoría de los tipos celulares de mamíferos, excepto las células murinas. La línea celular de empaquetamiento apropiada puede utilizarse para asegurar que las células de interés, en algún caso, las células injertadas, en algún caso, la célula del hospedador, es decir, el animal genéticamente modificado es la diana de las partículas virales empaquetadas.

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

40 Los agentes candidatos de interés para el cribado también incluyen polipéptidos. Dichos polipéptidos pueden fusionarse opcionalmente a un dominio polipeptídico que aumenta la solubilidad del producto. El dominio puede unirse al polipéptido a través de un sitio de escisión de proteasa definido, por ejemplo, una secuencia TEV, que se escinde mediante la proteasa TEV. El enlazador también puede incluir una o más secuencias flexibles, por ejemplo, de 1 a 10 restos de glicina. En algunas realizaciones, la escisión de la proteína de fusión se realiza en un tampón que mantiene la solubilidad del producto, por ejemplo, en presencia de 0,5 a 2 M de urea, en presencia de polipéptidos y/o polinucleótidos que aumentan la solubilidad, y similares. Los dominios de interés incluyen dominios endosomolíticos, por ejemplo, el dominio HA de la gripe; y otros polipéptidos que ayudan en la producción, por ejemplo, el dominio IF2, dominio GST, dominio GRPE y similares. Además, o como alternativa, dichos polipéptidos pueden formularse para una estabilidad mejorada. Por ejemplo, los péptidos pueden ser PEGilados, donde el grupo polietilenoxi proporciona una vida útil mejorada en el torrente sanguíneo. El polipéptido puede fusionarse a otro polipéptido para proporcionar funcionalidad adicional, por ejemplo, para aumentar la estabilidad *in vivo*. En general, dichas parejas de fusión son una proteína plasmática estable, que puede, por ejemplo, extender la semivida plasmática *in vivo* del polipéptido cuando está presente como una fusión, en particular, en donde dicha proteína plasmática estable es un dominio constante de inmunoglobulina. En la mayoría de los casos en que la proteína plasmática estable se encuentra normalmente en una forma multimérica, por ejemplo, inmunoglobulinas o lipoproteínas, en el que las mismas o diferentes cadenas polipeptídicas están unidas normalmente por enlaces disulfuro y/o no covalentemente para formar un polipéptido multicadena ensamblado, en el presente documento, las fusiones que contienen el polipéptido también se producirán y emplearán como un multímero que tiene sustancialmente la misma estructura que el precursor de la proteína plasmática estable. Estos multímeros serán homogéneos con respecto al agente polipeptídico que comprenden, o pueden contener más de un agente polipeptídico.

65 El agente polipeptídico candidato puede producirse a partir de células eucariotas, o puede producirse mediante células procariotas. Puede procesarse adicionalmente desplegándose, por ejemplo, por desnaturalización térmica, reducción de DTT, *etc.* y puede volverse a plegar, utilizando métodos conocidos en la técnica. Las modificaciones de

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

El agente polipeptídico candidato puede prepararse por síntesis *in vitro*, utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica. Varios aparatos sintéticos comerciales están disponibles, por ejemplo, sintetizadores automatizados por Applied Biosystems, Inc., Beckman, *etc.* Mediante la utilización de sintetizadores, los aminoácidos de origen natural pueden sustituirse por aminoácidos no naturales. La secuencia particular y la forma de preparación se determinarán por conveniencia, economía, pureza requerida y similares. Como alternativa, el agente polipeptídico candidato puede aislarse y purificarse de acuerdo con métodos convencionales de síntesis recombinante. Puede prepararse un lisado del hospedador de expresión y el lisado purificado utilizando HPLC, cromatografía de exclusión, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad u otras técnicas de purificación. En su mayoría, las composiciones que se utilizan comprenderán al menos el 20 % en peso del producto deseado, más normalmente al menos aproximadamente el 75 % en peso, preferentemente al menos aproximadamente el 95 % en peso y, para fines terapéuticos, normalmente al menos aproximadamente el 99,5 % en peso, en relación con los contaminantes relacionados con el método de preparación del producto y su purificación. Normalmente, los porcentajes se basarán en la proteína total.

En algunos casos, los agentes polipeptídicos candidatos a cribar son anticuerpos. El término "anticuerpo" o "fracción de anticuerpo" pretende incluir cualquier estructura molecular que contenga cadenas polipeptídicas con una forma específica que se ajuste y reconozca un epítipo, donde una o más interacciones de unión no covalentes estabilizan el complejo entre la estructura molecular y el epítipo. El ajuste específico o selectivo de una estructura dada y su epítipo específico a veces se denomina ajuste de "bloqueo y clave". La molécula de anticuerpo arquetípica es la inmunoglobulina, y todos los tipos de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, *etc.*, de todas las fuentes, por ejemplo, ser humano, roedor, conejo, una vaca, ovejas, cerdo, un perro, otros mamíferos, pollo, otras aves, *etc.*, se consideran "anticuerpos". Los anticuerpos utilizados en la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos se proporcionan normalmente en los medios en los que se cultivan las células. A continuación se describe en mayor detalle la producción y criba de anticuerpos.

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

Los agentes candidatos se criban para la actividad biológica mediante la administración del agente a al menos una y, normalmente, una pluralidad de muestras, a veces junto con muestras que carecen del agente. Se mide el cambio en los parámetros en respuesta al agente y se evalúa el resultado en comparación con las muestras de referencia, por ejemplo, en presencia y ausencia del agente, obtenido con otros agentes, *etc.* En los casos en los que se realiza un cribado para identificar los agentes candidatos que evitarán, mitigarán o revertirán los efectos de un patógeno, el cribado, generalmente, se realiza en presencia del agente patogénico, donde el agente patogénico se añade en el momento más apropiado para los resultados a determinar. Por ejemplo, en los casos en los que se prueba la capacidad protectora/preventiva del agente candidato, el agente candidato se puede añadir antes del patógeno, simultáneamente con el patógeno o posterior a la infección por el patógeno. Como otro ejemplo, en los casos en los que se prueba la capacidad del agente candidato para revertir los efectos de un patógeno, el agente candidato se puede añadir antes de la infección con el patógeno. Como se ha mencionado anteriormente, en algunos casos, la "muestra" es un animal no humano genéticamente modificado que se ha injertado con células, por ejemplo, el agente candidato se proporciona a un animal inmunodeficiente, por ejemplo, un ratón, que comprende un ácido nucleico que codifica EPO humana unida operativamente a un promotor EPO que se ha injertado con células hematopoyéticas humanas. En algunos casos, la muestra son las células hematopoyéticas humanas a injertar, es decir, el agente candidato se proporciona a las células, por ejemplo, reticulocitos, eritrocitos, *etc.*, antes de su injerto en el animal inmunodeficiente genéticamente modificado.

Si el agente candidato se va a administrar directamente al animal injertado genéticamente modificado, el agente se puede administrar mediante cualquiera de una serie de métodos bien conocidos en la técnica para la administración de péptidos, moléculas pequeñas y ácidos nucleicos a ratones. Por ejemplo, el agente puede administrarse por vía oral, por vía mucosa, por vía tópica, intradérmica, o por inyección, por ejemplo, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intravenosa o inyección intracraneal y similares. El agente puede administrarse en un tampón, o puede incorporarse en cualquiera de varias formulaciones, por ejemplo, por combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado. "Vehículos farmacéuticamente aceptables" pueden ser vehículos aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerados en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en mamíferos, tales como seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o transportador con el que un compuesto de la invención se formula para la administración a un mamífero. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser lípidos, por ejemplo, liposomas, por ejemplo, dendrímeros liposómicos; líquidos, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, solución salina; goma de acacia, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizando, espesantes, lubricantes y colorantes. Se pueden formular composiciones farmacéuticas en preparaciones en forma sólida, semisólida, líquida o gaseosa, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. El agente puede ser sistémico después de la administración o puede localizarse mediante la utilización de administración regional, administración intramural o la utilización de un implante que actúa para retener la dosis activa en el sitio de la implantación. El agente activo puede formularse para actividad inmediata o puede formularse para liberación sostenida. Para algunas afecciones, particularmente las afecciones del sistema nervioso central, puede ser necesario formular agentes para cruzar la barrera hematoencefálica (BHE). Una estrategia para el suministro de fármacos a través de la barrera del cerebro (BHE) implica la interrupción de la BHE, ya sea por medios osmóticos como el manitol o los leucotrienos, o bioquímicamente mediante la utilización de sustancias vasoactivas como la bradisinina. Un agente disruptivo de la BHE puede coadministrarse con el agente cuando las composiciones se administran mediante inyección intravascular. Otras estrategias para pasar por la BHE pueden implicar la utilización de sistemas de transporte endógenos, que incluyen transcitosis mediada por Caveolin-1, transportadores mediados por portadores como portadores de glucosa y aminoácidos, transcitosis mediada por receptor para insulina o transferrina, y transportadores de flujo activo tales como p-glicoproteína. Las fracciones de transporte activo también se pueden conjugar con los compuestos terapéuticos para su uso en la invención para facilitar el transporte a través de la pared endotelial del vaso sanguíneo. Como alternativa, la liberación de fármacos por detrás de la BHE puede realizarse mediante liberación local, por ejemplo, mediante liberación intratecal, por ejemplo, través de un depósito de Ommaya (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos números 5.222.982 y 5.385.582); mediante inyección en bolo, por ejemplo, mediante una jeringa, por ejemplo, intravital o intracranealmente; mediante infusión, por ejemplo, mediante canulación, por ejemplo, con convección (véase, por ejemplo, la Solicitud de Estados Unidos N° 20070254842.); o mediante implantación de un dispositivo sobre el cual el agente se ha fijado de manera reversible (véanse, por ejemplo, las solicitudes de los Estados Unidos Nos. 20080081064 y 20090196903.).

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

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

Puede realizarse un análisis de la respuesta de las células en el animal genéticamente modificado injertado en cuanto al M-CSF al agente candidato en cualquier momento después del tratamiento con el agente. Por ejemplo, las células pueden analizarse 1, 2, o 3 días, a veces 4, 5 o 6 días, a veces 8, 9 o 10 días, a veces 14 días, a veces 21 días, a veces 28 días, a veces 1 mes o más después del contacto con el agente candidato, por ejemplo, 2 meses, 4 meses, 6 meses o más. En algunas realizaciones, el análisis comprende análisis en múltiples puntos de tiempo. La selección del punto(s) de tiempo para el análisis se basará en el tipo de análisis que se realizará, tal como entenderá fácilmente el experto en la técnica.

El análisis puede comprender medir cualquiera de los parámetros descritos en el presente documento o conocidos

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

Por tanto, por ejemplo, se desvela un método para determinar el efecto de un agente sobre células eritroides infectables o infectadas por patógeno, que comprende la administración del agente a un ratón de EPO humana, por ejemplo, un ratón *Rag2^{-/-}IL2rg^{-/-}EPO^{mh}*, que se ha injertado con reticulocitos y/o eritrocitos humanos; que mide un parámetro de la viabilidad de las células injertadas a lo largo del tiempo en presencia del agente; y que compara esa medida con la medida de un ratón de EPO humana injertado no expuesto al agente. El agente se determina como antipatogénico si reduce la infección y/o la muerte de eritrocitos humanos en la sangre periférica del ratón en al menos un 20 %, 30 %, 40 % o más, en algunos casos, el 50 %, 60 %, 70 % o más, por ejemplo, 80 %, 90 % o un 100 %, es decir, a cantidades no detectables, seguido de una única administración o dos o más administraciones del agente a lo largo de un período de tiempo seleccionado. En una realización específica, la administración del fármaco o combinación de fármacos es de al menos tres días, al menos una semana, al menos 10 días después del injerto con células hematopoyéticas humanas, por ejemplo, dos semanas, tres semanas, o cuatro semanas después del injerto con células hematopoyéticas, por ejemplo, 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas, o más después del injerto con células hematopoyéticas.

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

EJEMPLOS DE ASPECTOS NO LIMITANTES DE LA DIVULGACIÓN

Los aspectos, incluyendo realizaciones, de la presente materia objeto descrita anteriormente pueden ser beneficiosos solos o en combinación, con uno o más otros aspecto o realizaciones. Sin limitar la anterior descripción, se proporcionan a continuación determinados aspectos no limitantes de la divulgación enumerados 1-58. Tal como será evidente para los expertos en la técnica tras la lectura de la presente divulgación, cada uno de los aspectos individualmente enumerados se puede usar o combinar con cualquiera de los anteriores o siguientes aspecto individualmente enumerados. Esto se pretende para proporcionar soporte a todas tales combinaciones de aspectos y no se limita a combinaciones de aspectos que se proporcionan explícitamente a continuación:

1. Un animal no humano genéticamente modificado, que comprende:
una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína EPO humana (hEPO) unida operativamente a un promotor de gen EPO.
2. El animal no humano de acuerdo con 1, en donde el promotor del gen EPO es un promotor de EPO no humano endógeno.
3. El animal no humano de acuerdo con 1, en donde la unión operativa es para el promotor de EPO no humana endógeno en el locus de EPO no humano.
4. El animal no humano de acuerdo con 3, en donde la unión operativa da como resultado una mutación nula en el gen EPO no humano en el locus del gen EPO no humano.
5. El animal no humano de acuerdo con 4, en donde el animal no humano es heterocigótico para el alelo que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la hEPO.
6. El animal no humano de acuerdo con 4, en donde el animal no humano es homocigótico para el alelo que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la hEPO.
7. El animal no humano de acuerdo con uno cualquiera de 1-6, en donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la hEPO comprende secuencia codificante y no codificante genómica de EPO humana.

8. El animal no humano de acuerdo con uno cualquiera de 1-6, en donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la hEPO comprende secuencia de ADNc EPO humana.
- 5 9. El animal no humano de acuerdo con uno cualquiera de 1-8, en donde el animal no humano expresa una o más proteínas humanas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en:
- 10 una proteína hM-CSF codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de *M-csf*,
una proteína de hIL3 codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de la *Il-3*,
una proteína hGM-CSF codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de *Gm-csf*,
una proteína hTPO codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de *TPO*, y
una proteína hSirpa codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de *Sirpa*.
- 15 10. El animal no humano de acuerdo con 9, en donde el promotor es un promotor de animal no humano endógeno en el locus del gen del animal no humano correspondiente y en donde el animal no humano es heterocigoto nulo para el gen no humano.
- 20 11. El animal no humano de acuerdo con 9, en donde el promotor es un promotor de animal no humano endógeno en el locus del gen del animal no humano correspondiente y en donde el animal no humano es homocigoto nulo para el gen no humano.
12. El animal no humano de acuerdo con 9, en donde las proteínas humanas incluyen al menos hTPO, hIL3, hGM-CSF y hSirpa.
- 25 13. El animal no humano de acuerdo con uno cualquiera de 1-12, en donde el animal no humano es inmunodeficiente.
- 30 14. El animal no humano de acuerdo con 13, en donde la inmunodeficiencia es causada por una deficiencia para uno o ambos de Rag2 e Il2rg.
- 35 15. El animal no humano de acuerdo con uno cualquiera de 1-14, en donde el mamífero no humano es un mamífero.
16. El animal no humano de acuerdo con 15, en donde el mamífero es un roedor.
- 40 17. El animal no humano de acuerdo con 16, en donde el roedor es un ratón.
18. El animal no humano de acuerdo con uno cualquiera de 1-17, en donde el animal no humano comprende un injerto de células hematopoyéticas humanas.
- 45 19. El animal no humano de acuerdo con 18, en donde las células hematopoyéticas humanas comprenden una o más células seleccionadas entre el grupo que consiste en células CD34 positivas humanas, una célula madre hematopoyética humana, una célula precursora mieloide humana, una célula precursora eritroide humana, una célula mieloide humana, una célula dendrítica humana, un monocito humano, un granulocito humano, un eritrocito humano, un neutrófilo humano, una célula mastocito humana, un timocito humano y un linfocito B humano.
20. El animal no humano de acuerdo con 19, en donde el animal no humano comprende clodronato.
- 50 21. El animal no humano de acuerdo con 20, en donde el animal no humano comprende adicionalmente una infección con un patógeno que se dirige a células humanas del linaje eritroide.
22. El animal no humano de acuerdo con 21, en donde el patógeno se selecciona entre una especie de *Plasmodium*, una especie de *Babesia* y una especie de *Theileri*.
- 55 23. Un método para identificar un agente que inhibe una infección por un patógeno que se dirige a células humanas del linaje eritroide, comprendiendo el método:
- 60 a. la administración de un agente candidato a un animal no humano genéticamente modificado, en donde el animal comprende:
- 65 i. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína EPO humana (hEPO) unida operativamente a un promotor de gen EPO,
ii. una o más mutaciones genéticas que dan como resultado la inmunodeficiencia en el animal no humano,
iii. un injerto de células hematopoyéticas humanas, y
iv. una infección por un patógeno que se dirige a células humanas del linaje eritroide, y

- b. la determinación de el agente reduce la cantidad del patógeno en el animal no humano infectado con patógeno.
- 5 24. Un método para identificar un agente que previene una infección por un patógeno que se dirige a células humanas del linaje eritroide, comprendiendo el método:
- a. poner en contacto un animal no humano genéticamente modificado con clodronato, en donde el animal no humano comprende:
- 10 i. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína EPO humana (hEPO) unida operativamente a un promotor de gen EPO,
 ii. una o más mutaciones genéticas que dan como resultado la inmunodeficiencia en el animal no humano,
 y
 15 iii. un injerto de células hematopoyéticas humanas,
- b. administrar un agente candidato a un animal no humano genéticamente modificado,
 c. inyectar al animal no humano genéticamente modificado reticulocitos o eritrocitos con parásitos, y
 d. determinar sin el agente previene la infección de los reticulocitos/eritrocitos humanos del animal no humano.
- 20 25. El método de acuerdo con 23 o 24, en donde el promotor del gen EPO es un promotor no humano endógeno.
26. El método de acuerdo con 23 o 24, en donde la unión operativa es para el promotor de EPO no humana endógeno en el locus de EPO no humano.
- 25 27. El método de acuerdo con 26, en donde la unión operativa da como resultado una mutación nula en el gen EPO no humano en el locus del gen EPO no humano.
28. El método de acuerdo con 27, en donde el animal no humano es heterocigótico para el alelo que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica hEPO.
- 30 29. El método de acuerdo con 27, en donde el animal no humano es homocigótico para el alelo que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica hEPO.
- 35 30. El método de acuerdo con uno cualquiera de 23-29, en donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la hEPO comprende secuencia codificante y no codificante genómica de EPO humana.
31. El método de acuerdo con uno cualquiera de 23-29, en donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica hEPO comprende secuencia de ADNc EPO humana.
- 40 32. El método de acuerdo con uno cualquiera de 23-31, en donde el animal no humano expresa una o más proteínas humanas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en:
- 45 una proteína hM-CSF codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de *M-csf*,
 una proteína de hIL3 codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de la *Il-3*,
 una proteína hGM-CSF codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de *Gm-csf*,
 una proteína hTPO codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de *TPO*, y
 una proteína hSirpa codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de *Sirpa*.
- 50 33. El método de acuerdo con 32, en donde el promotor es un promotor de animal no humano endógeno en el locus del gen del animal no humano correspondiente y en donde el animal no humano es heterocigoto nulo para el gen no humano.
- 55 34. El método de acuerdo con 33, en donde el promotor es un promotor de animal no humano endógeno en el locus del gen del animal no humano correspondiente y en donde el animal no humano es homocigoto nulo para el gen no humano.
- 60 35. El método de acuerdo con uno cualquiera de 23-34 en donde el animal no humano es deficiente de uno o ambos de Rag2 e Il2rg.
- 65 36. El método de acuerdo con uno cualquiera de 23-35, en donde las células hematopoyéticas humanas comprenden una o más células seleccionadas entre el grupo que consiste en células CD34 positivas humanas, una célula madre hematopoyética humana, una célula precursora mieloide humana, una célula precursora eritroide humana, una célula mieloide humana, una célula dendrítica humana, un monocito humano, un granulocito humano, un eritrocito humano, un neutrófilo humano, una célula mastocito humana, un timocito humano y un linfocito B humano.

37. El método de acuerdo con uno cualquiera de 23-36, en donde el patógeno se selecciona entre una especie de *Plasmodium*, una especie de *Babesia* y una especie de *Theileri*.
- 5 38. El método de acuerdo con 37, en donde el patógeno es una especie de *Plasmodium* y la especie de *Plasmodium* se selecciona de *P. falciparum* y *P. vivax*.
39. El método de acuerdo con uno cualquiera de 23-38, en donde el mamífero no humano es un mamífero.
- 10 40. El método de acuerdo con 39, en donde el mamífero es un roedor.
41. El método de acuerdo con 40, en donde el roedor es un ratón.
- 15 42. Un método para fabricar un ratón que expresa una proteína EPO humana (hEPO), que comprende:
poner en contacto una célula madre pluripotente de ratón con una secuencia de ácido nucleico que comprende secuencia codificante para hEPO o un fragmento de la misma unida operativamente a secuencia de promotor EPO, en donde la secuencia codificante y la secuencia de promotor EPO forman un casete que está flanqueado por secuencias que son homólogas con respecto al locus EPO de ratón endógeno,
20 cultivar la célula madre pluripotente en condiciones de promueven la integración de la secuencia de ácido nucleico en el genoma de ratón en el locus EPO de ratón endógeno mediante recombinación homóloga; y fabricar un ratón a partir de la célula madre pluripotente de ratón que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica una hEPO.
- 25 43. El método de acuerdo con 42, en donde la célula madre pluripotente de ratón en una célula madre es una célula ES o una célula iPS.
44. El método de acuerdo con 42 o 43, en donde la célula madre pluripotente de ratón es deficiente de Rag2 y/o IL2rg.
- 30 45. El método de acuerdo con uno cualquiera de 42-44, en donde la secuencia de promotor de EPO es secuencia para el promotor de EPO humana.
46. El método de acuerdo con uno cualquiera de 42-44, en donde la secuencia de promotor de EPO humana es secuencia para el promotor de EPO no humana endógena.
- 35 47. El método de acuerdo con uno cualquiera de 42-46, en donde la integración da como resultado una sustitución del gen EPO no humano en el locus del gen EPO no humano.
- 40 48. El método de acuerdo con uno cualquiera de 42-47, en donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica hEPO comprende secuencia codificante y no codificante genómica de EPO humana.
49. El método de acuerdo con uno cualquiera de 42-48, en donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica hEPO comprende secuencia de ADNc EPO humana.
- 45 50. Un método para fabricar un ratón que expresa una proteína EPO humana (hEPO) y que comprende un sistema hematopoyético humano, que comprende:
trasplantar una población de células que comprende células progenitoras hematopoyéticas humanas en el ratón genéticamente modificado fabricado mediante un método de acuerdo con cualquiera de 42-49.
- 50 51. El método de acuerdo con 50, en donde el trasplante comprende inyección de vena caudal, inyección de hígado fetal o inyección retro-orbital.
- 55 52. El método de acuerdo con 50 o 51, en donde el ratón genéticamente modificado se irradia subletalmente antes de su trasplante.
53. El método de acuerdo con uno cualquiera de 50-52, en donde las células progenitoras hematopoyéticas humanas son células CD34+.
- 60 54. El método de acuerdo con uno cualquiera de 50-53, en donde las células progenitoras hematopoyéticas humanas son células progenitoras de hígado fetal, médula ósea adulta o sangre de cordón umbilical.
- 65 55. Un método para fabricar un ratón que se infecta con un patógeno humano que se dirige a células humanas del linaje eritroide, que comprende:
producir un ratón que expresa una proteína de EPO humana (hEPO) y que comprende un sistema

hematopoyético humano de acuerdo con los métodos de 50-54,
inyectar el ratón con clodronato, e
inyectar el ratón con glóbulos rojos humanos con parásitos (PRBC).

5 56. El método de acuerdo con 55, en donde el método comprende adicionalmente inyectar al ratón glóbulos rojos humanos sanos.

10 57. El método de acuerdo con 55, en donde el parásito se selecciona entre una especie de *Plasmodium*, una especie de *Babesia* y una especie de *Theileri*.

58. El método de acuerdo con 57, en donde el parásito es una especie de *Plasmodium* y la especie de *Plasmodium* se selecciona de *P. falciparum* y *P. vivax*.

15 Ejemplos

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

25 Los métodos generales en bioquímica molecular y celular se pueden encontrar en libros de texto estándar como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Ed. (Sambrook et al., HaRBor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4ª Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kapliff & Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); y Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998). Los reactivos, vectores de clonación y kits para la manipulación genética a los que se hace referencia en esta divulgación están disponibles en proveedores comerciales como BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich y ClonTech.

35 Ejemplo 1

Generación de ratón activado con EPO humana.

40 Se sustituyó la secuencia codificante en el locus del gen de eritropoyetina de ratón (ID de gen NCBI de ratón: 13856; MGL95407; RefSeq de transcripción de ADNc en NM 007942.2 (SEQ ID NO: 1) y proteína codificada en NP 031968 (SEQ ID NO:2)) con secuencia codificante del locus del gen de eritropoyetina humana (ID de Gen NCBI de ser humano:2056; HGNC: 3415; RefSeq de transcripción de ADNc en NM 000799.2 (SEQ ID NO:3) y proteína codificada en NP 000790 (SEQ ID NO:4)).

45

Tabla 1

<p>SEQ ID NO: 1</p>	<p>1 gatgaagact tgcagcgtgg acactggccc agccccgggt cgctaaggag ctccggcagc 61 tagggcggga gatgggggtg cccgaacgtc ccacctgct gcttttactc tccttgctac 121 tgattcctct gggcctccca gtctctgtg ctccccacg cctcatctgc gacagtcgag 181 ttctggagag gtacatctta gaggccaagg aggcagaaaa tgtcacgatg ggttgtgcag 241 aaggtcccaag actgagtgaa aatattacag tcccagatac caaagtcaac ttctatgctt 301 ggaaaagaat ggaggtggaa gaacaggcca tagaagtttg gcaaggcctg tccttgcctc 361 cagaagccat cctgcaggcc caggccctgc tagccaattc ctcccagcca ccagagaccc 421 ttcagcttca tatagacaaa gccatcagtg gtctacgtag cctcacttca ctgcttcggg 481 tactgggagc tcagaaggaa ttgatgtcgc ctccagatac caccaccctt gctccactcc 541 gaacactcac agtggatact ttctgcaagc tcttccgggt ctacgccaac ttccctccggg 601 ggaactgaa gctgtacacg ggagaggtct gcaggagagg ggacaggtga catgctgctg 661 ccaccgtggt ggaccgacga acttgcctcc cgtcactgtg tcatgccaac cctccc (SEQ ID NO:1)</p>
<p>SEQ ID NO: 2</p>	<p>MGVPERPTLLLSLLIPLGLPVLCAAPRLICDSRVLERYILEAKEAENVMTMCGAFGPRLSENITVP DTKVNFYAWKRMEVEEQAIQVWQGLSLLSEAILQAQALLANSSQPPELTLQLHIDKAIISGLRSLTSL LRVLGAQKELMSPDDTTTPAPLRLTVDFCKLFRVYANFLRGKLLKLYTGEVCRRGDR (SEQ ID NO:2)</p>

Cont. de Tabla 1.	
SEQ ID NO: 3	<p>1 cccggagccg gaccggggcc accggcccg ctctgctccg acaccggcc ccctggacag</p> <p>61 ccgccccttc ctccaggccc gtggggctgg ccctgcaccg ccgagcttcc cgggatgagg</p> <p>121 gccccgggtg tggtcaccgg ggcgcgccca ggtcgctgag ggaacccggc caggcgcgga</p> <p>181 gatgggggtg cacgaatgtc ctgctctggt gtggcttctc ctgtccctgc tgtcgctccc</p> <p>241 tctgggcttc ccagtccctg ggcgccacc acgcctcacc tgtgacagcc gagtccctgga</p> <p>301 gaggtaacct ttggaggcca aggaggccga gaatatcacc acgggctgtg ctgaacactg</p> <p>361 cagcttgaat gagaatacca ctgtcccaga caccaaagtt aatttctatg cctggaagag</p> <p>421 gatggaggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcggaaagc</p> <p>481 tgtcctgctg ggcacaggcc tgttgggtcaa ctctcccag ccgtgggagc ccctgcagct</p> <p>541 gcatgtggat aaagccgtca gtggcctctg cagcctcacc actctgcttc gggctctggg</p> <p>601 agcccagaag gaagccatct cccctcccga tgcggcctca gctgctccac tccgaacaat</p> <p>661 cactgctgac actttccgca aactctctcg agtctactcc aatttcttcc ggggaaagct</p> <p>721 gaaagctgtac acaggggagg cctgcaggac aggggacaga tgaccaggtg tgtccacctg</p> <p>781 ggcataatcca ccacctccct caccaaacatt gcttgtgcca caccctcccc cgccactcct</p> <p>841 gaaacccctc gaggggctct cagctcagcg ccagcctgtc ccatggacac tccagtgccca</p> <p>901 gcaatgacat ctccaggggccc agaggaactg tccagagagc aactctgaga tctaaggatg</p> <p>961 tcacagggcc aacttgaggg ccacagagcag gaagcattca gagagcagct ttaaactcag</p> <p>1021 ggcacagagc atgctgggaa gacgctgag ctccactggc accctgcaaa atttgatgcc</p> <p>1081 aggcacacgt ttggaggcga tttacctgtt ttgcacctc ccatcaggga caggatgacc</p> <p>1141 tggagaaact aggtggcaag ctgtgacttc tccaggtctc acgggcatgg gcactccctt</p> <p>1201 ggtggcaaga gcccccttga caccggggtg gtgggaacca tgaagacagg atgggggctg</p> <p>1261 gcctctggtc ctcatgggtt ccaagtttgg tgtattcttc aacctcattg acaagaactg</p> <p>1321 aaccaccaca aaaaaaaaa (SEQ ID NO:3)</p>
SEQ ID NO: 4	<p>MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPRRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC</p> <p>SLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEP</p> <p>LQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTRKLFYVSNFLR</p> <p>GKLLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:4)</p>

De manera específica, la región genómica de ratón en GRCm38: ch5: 137482017:137485745 (cadena negativa) se eliminó y secuencia genómica humana de GRCh37: ch7:100318604:100321567 (cadena positiva) se insertó en su lugar. Esto dio como resultado la sustitución de exones codificantes de 1 a 5 -- la región codificante completa -- del gen de Epo de ratón con exones de 1 a 5 más la región no traducida humana del extremo 3' del gen EPO humana. En total, 3729 nt de secuencia de ratón se sustituyó con 2964 nt de secuencia de ser humano.

Brevemente, una construcción directora para sustituir el gen de EPO de ratón con el gen de EPO de ser humano en una única etapa de direccionamiento se construyó usando tecnología de ingeniería genética de VELOCIGENE® (véase, Valenzuela et al. (2003), citado anteriormente, y la Patente de Estados Unidos n.º 6.586.251). Se obtuvieron ADN de la EPO de ratón y de ser humano a partir de cromosomas artificiales bacterianos bMQ-386K4 y RP11-797M3, respectivamente. Una construcción directora linealizada por PspXI generada por clonado de reparación de espacio que contiene brazos de homología corriente arriba y corriente abajo de EPO de ratón que flanqueaba una 2964 nt de secuencia de EPO humana que se extendía desde ATG en el exón 1 hasta el codón de detención en el exón 5 (es decir incluida la secuencia corriente abajo 3') más un casete de selección de neo floxeado se electroporó en células ES de Rag2^{-/-} IL2rg^{Y/-} (FIG. 2 y FIG. 3). La unión entre la región no traducida (UTR) de extremo 5' de EPO de ratón y el exón 1 de EPO humana se proporciona como SEQ ID NO: 5, en donde el nucleótido de ratón final antes del primer nucleótido del gen humano es la "G" (mostrado en corchetes) en la porción de la SEQ ID NO:5 que no se pone en negrita en la Tabla 2 a continuación y el primer nucleótido de la secuencia humana es la "A" (mostrada entre corchetes) en la porción en negrita de la SEQ ID NO:5 en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

SEQ ID NO: 5	TCTTCCAGGCTAGTGGGGTGATCTGGCCCTACAGAAGCTCCAAGGATGAAGACTTGCAGCGTGGACACTGGCCAGCCCCGGGTGCGTAAGGAGCTCCGGCAGCTAGGCGCGGA[G][A] <i>JTGGGGGTGCACGGTGAGTACTCGCGGGCTGGGCGCTCCCGCCCGCCGGGTCCCTGTTGAGCGGGGATTTAGCGCCCCGGCTATTGCCAGGAGGTGGCTGGGTTCAAG</i> (SEQ ID NO:5) (la secuencia codificante de exón 1 humano está en cursiva, la negrita es de ser humano, y no en negrita es de ratón)
--------------	--

La unión entre la UTR de extremo 3' humana y el extremo 5' del casete de selección se proporciona como SEQ ID NO:6, en donde el nucleótido final de la secuencia humana es la "C" (mostrada en corchetes sencillos) en la porción en negrita de la SEQ ID NO:6 en la Tabla 3 a continuación y el primer nucleótido de la secuencia de casete de selección es la "C" (mostrada entre corchetes dobles) en la porción no en negrita de la SEQ ID NO:6 en la Tabla 3 a continuación; la región de unión corriente abajo también está contenida en un sitio loxP en el extremo 3' para la retirada de un casete neo conducido por promotor de ubiquitina floxeado.

Tabla 3

SEQ ID NO: 6 <i>ACTCCGAACAATCACTGCTGACACTTTCGCAAACCTCTTCCGAGTCTACTCCA</i> <i>ATTTCTCCGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGACAGATGACCAGGTGTGTCACCTGGGCATATCCACCACCTCCCTCACCAACATTGCTTGTGCCACACCCTCCCCGCCACTCCTGAACCCCGTCGAGGGGCTCTCAGCTCAGCGCCAGCCTGTCCATGGACACTCCAGTGCCAGCAATGACATCTCAGGGGCCAGAGGA</i> <i>ACTGTCCAGAGAGCAACTCTGAGATCTAAGGATGTCACAGGGCCA</i> ACTT <i>GAGGGCCAGAGCAGGAAAGCATT</i> CAGAGAGCAGCTTTAAACTCAGGGACAGAGCCATGCTGGAAAGACGCCTGAGCTCACTCGGCACCCTGCAAAATTTGATGCCAGGACACGCTTGGAGGCGATTTACCTGTTTTCGCACCTACCATCAGGGACAGGATGACCTGGAGA <i>ACTTAGGTGGCAAGCTGTGACTTCTCCAGGTCTCACGGGCATGGGCACTCCCTTGTGGCAAGAGCCCCCTTGACACCGGGGTGGTGGGAACCATGAAGACAGGATGGGGCTGGCCTCTGGCTCTCATGGGGTCCAAGTTTTGTGTATTCTTCAACCTCATTGACAAGA</i> ACTGAAACCACCAATATGACTCTTGGCTTTTCTGTTTTCTGGGAACCTCA <i>AATCCCCTGGCTCTGTCCCCTCTGGCAGTGCAGCAGGTCCAGGTCCGGGAACAGGAGGAGGAGGAGGGGCTGGGCCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACTCTCAGACCCTACCGGGCCTGAGGCCACAAGCTCTGCCTACGCTGGTCAATAAGGTGCTCTCCATTCAAGGCCTCACCGCAGTAAGGCAGCTGCCAA[C][C]]TCGAGATAAC</i> <i>TTCGTATAATGTATGCTATAACGAAGTTATATGCATGGCCTCCGCGCCGGGTTTTGGCGCC</i> <i>TCCCGCGGGCGCCCCCTCCTCACGGCGAGCGCTGCCAGTCAGACGAAGGGCGCAG...</i> (negrita es humano, cursiva es secuencia codificante de exón humano 5; no negrita es extremo 5' de casete de selección)
--------------	---

La unión entre el extremo 3' del casete de selección y el genoma de ratón se proporciona como SEQ ID NO:7, en donde la "C" que se muestra en corchetes sencillos es el nucleótido final del casete neo y el primer nucleótido del

genoma de ratón que sigue el casete es la "G" que se muestra en corchetes dobles, como se muestra en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

SEQ ID NO: 7	<p><i>GCCTCTGTTCCACATACACTTCATTCTCAGTATTGTTTTGCCAAGTTCTAATTCCATCAGACCTC GACCTGCAGCCCCTAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGCTAG[C][[G]]CCA ACCCGCTAGGACAAGTGCTGAGTGAGCTGGGGCCACCGTTTGGAGAAAACAGGAGCCAG TACAGAGGGGTTCCCCTTTAGGGGTTGGTGGCAATGGGCGACCCTGGTTAATGGATCAT T.....</i></p> <p>(el extremo 3' del casete de selección se muestra en cursiva, la secuencia de ratón no se muestra en cursiva).</p>
-----------------	---

5

Se identificaron clones de células ES de hEPO correctamente dirigidas mediante por ensayo de pérdida de alelo nativo (LONA) (Valenzuela et al. 2003) en la que se determinó el número de copias del gen de EPO nativo, sin modificar a través de dos reacciones en cadena la polimerasa cuantitativa TaqMan™ (qPCRs) específicas para secuencias en el gen EPO de ratón dirigidas para delección. Los ensayos qPCR comprendieron los siguientes conjuntos de cebador-sonda (escrito 5' a 3'): cebador directo corriente arriba, CATCTGCGACAGTCGAGTTC (SEQ ID NO:8); cebador inverso corriente arriba, CCAGGGAGCTTACCGTGAC (SEQ ID NO:9); sonda corriente arriba, FAM-AGGTACATCTTAGAGGCCAAGGAGGCA-BHQ (SEQ ID NO:10); cebador directo corriente abajo, ACAGCCGAGTCTCTGGAGAG (SEQ ID NO:11); cebador inverso corriente abajo, AAGCCCTGAGCGTGAGTTC (SEQ ID NO:12); sonda corriente abajo, FAM-AGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCACG-BHQ (SEQ ID NO: 13); en la que FAM se refiere a la sonda fluorescente 5-carboxifluoresceína y BHQ se refiere al interruptor de fluorescencia de tipo interruptor de orificio negro (Biosearch Technologies). Se combinó el ADN purificado desde clones de célula ES que han capturado el vector dirigido e incorporado en sus genomas con TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en una placa de PCR de 384-pocillos (MicroAmp™ Optical 384-Well Reaction Plate, Life Technologies) y se cicló en un Prism 7900HT de Applied Biosystems, que recoge los datos de fluorescencia durante el transcurso de la PCR y determina el ciclo umbral (Ct), el ciclo de PCR fraccionado en el que la fluorescencia acumulada llega a un umbral pre-determinado. Se llevaron a cabo las qPCR específicas de EPO corriente arriba y corriente abajo y se pusieron en marcha dos qPCR para genes de referencia no dirigidos para cada muestra de ADN. Se calcularon las diferencias en los valores Ct (ΔCt) entre cada qPCR específica de EPO y se calculó cada qPCR de gen de referencia y después la diferencia entre cada ΔCt y la mediana ΔCt para todas las muestras para obtener valores $\Delta\Delta Ct$ para cada muestra. Se calculó el número de copias del gen de EPO en cada muestra con la siguiente fórmula: número de copias = $2 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Un clon dirigido correctamente, que ha perdido una de sus copias nativas tendrá un número de copias de gen EPO igual a uno. Se confirmó que el la secuencia del gen EPO humana reemplazó la secuencia del gen EPO de ratón suprimida en el alelo humanizado mediante un ensayo qPCR TaqMan™ que comprendió los siguientes conjuntos de cebador-sonda (escrito de 5' a 3'): el cebador directo humano, GAGCCCTGCACTGGACAAC (SEQ ID NO: 14); el cebador inverso humano, TCCCATGAACGCTGAGAGTC (SEQ ID NO: 15); y la sonda humana, AGGGTCAAGGAGCCATAGACAGAATGGC (SEQ ID NO:16).

10

15

20

25

30

Las células ME correctamente dirigidas se electroporaron con un vector transitorio que expresa Cre para eliminar el casete de selección de fármaco. Para generar un ratón que comprende EPO humana y deficiente de *Rag2* y *Il2rg*, se identificaron células ES correctamente dirigidas tal como se ha descrito anteriormente y se introdujeron en embrión preimplantación usando técnicas conocidas en la técnica. Ratones activados (KI) de EPO humana se retrocruzaron a continuación para generar ratones deficientes de *Rag2* y *Il2rg* y que expresaban EPO humana.

35

40 **Ejemplo 2**

Generación de ratón de SIRP α humana.

En conexión con algunas de los ejemplos que se describen en el presente documento, un ratón genéticamente modificado que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifican SIRP α humana integrada aleatoriamente en el genoma de ratón genéticamente modificado se preparó tal como se ha descrito en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2013/0340105.

45

En conexión con algunas de los ejemplos que se describen en el presente documento, se preparó un ratón activado con SIRP α humana tal como se describe a continuación. La SIRP α humana se conoce que existe en 10 formas alélicas. En este ejemplo particular, la variante de SIRP α humana 1 se emplea para humanizar un gen de SIRP α endógeno de un ratón.

50

Se construyó un vector de direccionamiento para la humanización de una región extracelular de un gen de SIRP (por ejemplo, SIRP α) usando tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. n.º 6.586.251 y Valenzuela et al. (2003), citado anteriormente).

55

Brevemente, el clon del cromosoma artificial bacteriano (BAC) de ratón bMQ-261H14 se modificó para suprimir la

- secuencia que contenía exones de 2 a 4 de un gen de SIRP α endógeno e insertar exones de 2 a 4 de un gen SIRP α humano usando clon de BAC humano CTD-3035H21. El ADN genómico correspondiente a los exones de 2 a 4 de un gen SIRP α endógeno (~8555 pb) se remplazó en clon de BAC bMQ-261H14 con un fragmento de ADN de ~8581 pb que contenía exones de 2 a 4 de un gen de SIRP α humano del clon de BAC CTD-3035H21. El análisis secuencial del alelo de SIRP α humano contenido en el clon de BAC CTD-3035H21 reveló el alelo para corresponderse con la variante humana 1. Se añadió un casete de neomicina flanqueado por sitios *loxP* en el extremo del fragmento de ADN humano de ~8581 pb que contenía exones de 2 a 4 del gen de SIRP α humana (FIG. 4).
- Se obtuvieron los brazos de homología corriente arriba y corriente abajo de ADN de BAC de ratón en las posiciones de extremo 5' y extremo 3' de exones 2 y 4, respectivamente, y se añadió al casete de fragmento-neomicina humano de ~8581 pb para crear el vector de direccionamiento final para la humanización de un gen de SIRP α endógeno, que contenía de extremo 5' a extremo 3' un brazo de homología de extremo 5' que contenía 19 kb de ADN de ratón de extremo 5' exón 2 de gen de SIRP α endógeno, un fragmento de ADN de ~8581 pb que contenía exones de 2 a 4 de un gen de SIRP α humano, un casete de neomicina flanqueado por sitios *loxP* y un brazo de homología de extremo 3' que contenía 21 kb de ADN de ratón de extremo 3' de exón 4 de un gen de SIRP α endógeno. La inserción dirigida del vector de direccionamiento posicionó el casete de neomicina en el quinto intrón de un gen de SIRP α de ratón entre los exones 4 y 5. El vector de direccionamiento se linealizó digiriendo con *SwaI* y, a continuación, se usó en recombinación homóloga en células bacterianas para conseguir un remplazo dirigido de exones de 2 a 4 en un gen de SIRP α de ratón con exones de 2 a 4 de gen de SIRP α humana (FIG. 4).

El ADN de BAC dirigido (descrito anteriormente) se usó para electroporar células ES de ratón a células ES modificadas creadas que comprenden una sustitución de exones de 2 a 4 en un gen de SIRP α de ratón endógeno con un fragmento genómico que comprende exones de 2 a 4 de un gen de SIRP α humano. Células ES positivas que contenían un fragmento genómico que comprendía exones de 2 a 4 de un gen SIRP α humano se identificaron mediante PCR cuantitativa usando sondas TAQMAN™ (Lie and Petropoulos, 1998. *Curr. Opin. Biotechnology* 9:43-48). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente arriba incluyó lo siguiente, que indica la secuencia endógena de ratón en la dirección 5' del punto de inserción (contenida en los paréntesis siguientes) unida de forma contigua a una secuencia genómica de SIRP α humana presente en el punto de delección:

(AGCTCTCCTACCACTAGACTGCTGAGACCCGCTGCTCTGCTCAGGACTCGATTTCCAGTACACAATCTCCCTCTTTGAAAAGTACCACACATCCTGGGGT)GCTCTTGCATTTGTGTGACACTTTGCTAGCCAGGCTCAGTCCTGGGTTCCAGGTGGGGACTCAAACACACTGGCAGGAGTCTACATTGGATATTCTTGGT (SEQ ID NO: 17). La secuencia de nucleótidos por todo el punto de inserción corriente abajo en el extremo 5' del casete de neomicina incluyó lo siguiente, lo que indica secuencia genómica SIRP α humana contigua con secuencia de casete corriente abajo del punto de inserción (contenido dentro del paréntesis a continuación con secuencia *loxP* en cursiva):

GCTCCCCATTCTCACTGGCCAGCCCTCTCCCTACTCTTTCTAGCCCCTGCCTCATCTCCCTGGCTGCCATTGGGAGCCTGCCCCACTGGAAGCCAG(TCGAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATATGCATGGCC TCCGCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCCCTCCTCACGGCGA) (SEQ ID NO: 18). La secuencia de nucleótidos por todo el punto de inserción corriente abajo en el extremo 3' del casete de neomicina incluía lo siguiente, lo que indica la secuencia del casete contigua con la secuencia genómica de ratón en la dirección 3' del exón 4 de un gen SIRP α endógeno (contenido en los paréntesis siguientes):

CATTCTCAGTATTGTTTTGCCAAGTTCTAATTCCATCAGACCTCGACCTGCAGCCCCTAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGCTAGC(TGTCTCATAGAGGCTGGCGATCTGGCTCAGGGACAGCCAGTACTGCAAAG AGTATCCTTGTTTCATACCTTCTCCTAGTGGCCATCTCCCTGGGACAGTCA) (SEQ ID NO: 19). A continuación, se usaron clones de células ES positivas para implantar ratones hembra usando el método de VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. n.º 7.294.754 y Poueymirou et al. 2007, F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor genotargeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses *Nature Biotech.* 25(1):91-99, anteriormente citado) para generar una camada de crías que contuviera una inserción de exones de 2 a 4 de un gen SIRP α humano en un gen SIRP α endógeno de un ratón.

Las células ES dirigidas anteriormente descritas se utilizaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en la fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (anteriormente citado). Ratones que portaban la humanización de exones de 2 a 4 de un gen SIRP α endógeno se identificaron mediante genotipado usando un ensayo de alelo de modificación (Valenzuela et al. (2003), citado anteriormente) que detectó la presencia de las secuencias de gen SIRP α humano.

Ratones que portaban la construcción de gen SIRP α humanizado (es decir, contenían exones de STRP α humana de 2 a 4 en un gen de STRP α de ratón) pueden criarse a una cepa de ratón de supresión de Cre (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2009/114400) a fin de eliminar cualquier casete de neomicina floxeado introducido por el vector director que no se elimina, por ejemplo, en la fase de célula ES o en el embrión. Opcionalmente, el casete de neomicina queda retenido en los ratones.

Ejemplo 3

65 Generación de ratón activado de compuesto.

Se cruzaron ratones de activación de EPO humana en ratones que expresaban otros genes humanos de interés bien como integrantes aleatorios en el genoma de ratón o como activadores, es decir, desde el locus de ratón correspondiente. Por ejemplo, *Ratones KI Rag2^{-/-}, IL-2rg^{+/+}, hEPO* se cruzaron con ratones que expresaban TPO humana a partir del locus de TPO de ratón (Rongvaux et al., 2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108(6): 2378-2383), IL-3 humana y GM-CSF humana a partir del locus IL-3/GM-CSF de ratón (Willingier et al, 2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108(6): 2390-2395), M-CSF humana a partir del locus M-CSF de ratón (Rathinam et al, 2011, Blood, 118(11): 3119-3128), y/o SIRPa humana expresada como un integrante aleatorio (Strowig et al., 2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108(32): 13218-13223) o a partir del locus de ratón tal como se ha descrito anteriormente para generar ratones que expresaban una combinación de estas proteínas humanas (*Rag2^{-/-}Il2rg^{null}hSIRPa^{h/h} Tpo^{h/h} Mcsf^{h/h} Il3/Gmcsf^{h/h} EPO^{h/h}*). Ratones genéticamente modificados que expresaban una o más TPO humana, IL-3 humana, GM-CSF humana, M-CSF humana y SIRPa humana se describen en mayor detalle en la patente de los EE.UU. n.º 8.541.646 y 8.847.004; publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2014/0134662; y publicación internacional PCT n.º WO / 2014/039782

15 Ejemplo 4

Desarrollo de un modelo de ratón humanizado para los estadios en sangre de *P. falciparum* y *P. vivax*

En el presente documento se demuestra que la humanización genética del huésped murino proporcionando factores de crecimiento puede reforzar exitosamente el injerto celular humano en general y la eritropoyesis en particular en ratones injertados con células madre hematopoyéticas (HSC).

Los ratones MITERG que expresan EPO humana a partir de su genoma (para potenciar la eritropoyesis terminal) así como la TPO, MCSF y IL-3 humanas (para potenciar el mantenimiento de HSC y eritropoyesis temprana) muestran niveles superiores de eritropoyesis humana en la médula ósea de ratones injertados con HSC que ratones que no expresan hEPO (FIG. 5A, comparación de "hSIRPa-, hEPO+" (es decir, "ratones MITERG"), con "hSIRPa-, hEPO-" (es decir, "ratones MITRG")), de hecho, equivalente con eritropoyesis de ratón en el mismo animal. Sin embargo, estos ratones carecen de niveles significantes de células eritroides humanas en circulación (datos no mostrados).

Se hipotetizó que bajos niveles de células eritroides humanas en circulación en la periferia resulta de la destrucción de los RBC periféricos humanos (eritrofagocitosis) por macrófagos de ratón. El papel de la SIRPa en este proceso se evaluó generando ratones en los que se expresó hSIRPa a partir de un locus en el genoma de ratón distintos al locus de mSIRPa, es decir, como un transgén integrado aleatoriamente, es decir, una hSIRPa-tg (*Rag2^{-/-} Il2rg^{null} Tpo^{h/h} Mcsf^{h/h} Il3^{h/h} Gmcsf^{h/h} Epo^{h/h} SIRPa-tg+*, es decir, "ratones MISTER-G") y ratones en los que hSIRPa se expresó como una activación (KI) desde el locus mSIRPa, es decir, una hSIRPa KI (*Rag2^{-/-} Il2rg^{null} Tpo^{h/h} Mcsf^{h/h} Il3^{h/h} Gmcsf^{h/h} Epo^{h/h} SIRPa^{h/h}*, es decir, "ratones Super-G").

La expresión de SIRPa humana, por ejemplo, un transgén integrado aleatoriamente en ratones MISTER-G, promovió un aumento adicional en el número de células eritroides humanas en la médula ósea de ratones injertados con HSC humanos que expresaban EPO humana (FIG. 5, Panel A, comparación de "hSIRPa+, hEPO+" con "hSIRPa-, hEPO+"). La introducción de SIRPa humana mejoró significativamente la supervivencia de la mayoría de células hematopoyéticas en la periferia, con la frecuencia de células CD45⁺ humanas que incluían células linfoides y mieloides en sangre periférica que aumentaba al menos 10 veces sobre lo observado en ratones que no expresaban hSIRPa. Sin embargo, la KI de hSIRPa tiene poco efecto en los niveles de injerto de RBC humanos en sangre periférica (FIG. 5, Panel B).

Puesto que la activación de SIRPa humana no es suficiente para aumentar las células eritroides humanas en la sangre periférica, se usaron liposomas de clodronato para el empobrecimiento de macrófagos, especialmente, macrófagos de pulpa roja en el bazo y células Kupffer en el hígado. Se observó un aumento drástico de células humanas en circulación del linaje eritroide en ratones Super-G al 1 % de las células eritroides en circulación totales después del empobrecimiento de macrófagos residentes en tejido mediante liposoma de clodronato (FIG. 6, Panel A). Además, la mayoría de células eritroides en la periferia después del tratamiento con clodronato fueron reticulocitos (CD71) (FIG. 6, Panel B). Esto es una observación entusiastamente puesto que indica que estos ratones podrían ser buenos candidatos para soportar la infección de *P. vivax*, que infecta preferiblemente reticulocitos.

La infección de células eritroides es una parte esencial del ciclo de vida de la especie de *Plasmodium*. Sin embargo, no se ha establecido la frecuencia necesaria de RBC humanos para una infección *in vivo* exitosa con distintas especies de *Plasmodium*. Solo los modelos *in vivo* de *P. falciparum* disponibles en este momento se basan en la transferencia de RBC humanos en cepas inmunodeficientes tales como NOD/scid o NSG. En estos ratones, la infección con merozoitos se puede lograr mediante inyección i.v. de eritrocitos humanos solo después de la inyección diaria de grandes cantidades de eritrocitos humanos. En el momento de la infección, los RBC humanos comprenden aproximadamente la mitad del número total de eritrocitos en estos animales.

Como se demuestra anteriormente, ratones Super-G injertados con células madre hematopoyéticas (HSC) desarrollaron células eritroides humanas en la médula ósea (FIG. 5B) y ii) el tratamiento con clodronato aumentó la

frecuencia de células eritroides humanas en la periferia de ratones SupER-G injertados (FIG: 6). Para determinar si están injertados, los ratones SupER-G tratados con clodronato comprendía un número suficiente de células eritroides en la periferia para mantener una infección de *Plasmodium* exitosa *in vivo*, se recogió la sangre periférica de los ratones SupER-G injertados con HSC adulto o hígado fetal y la sangre cultivada *in vitro* con sangre infectada de 3D7 de cepa de *P. falciparum*. Para facilitar múltiples rondas de replicación de parásitos, se añadieron glóbulos rojos humanos frescos en el cultivo de infección 48 horas después, siendo la expectativa que la amplificación mediante reinfección de los RBC humanos añadidos posteriormente solo se producirá si los RBC humanos recogidos de los ratones SupER-G injertados con HSC hubieran producido el ciclo completo infeccioso de *P. falciparum*. Doce días después de la infección, se observó la fase avanzada de infección parasitaria y amplificación de merozoitos en todas las muestras de sangre a partir de ratones SuPER-G injertados ("RBC de ratones injertados", adulto 1", "RBC de ratón injertados, adulto 2" y "RBC de ratón injertados, hígado fetal") pero no de ratones de control que o bien no están injertados o están plenamente injertados con 0,1 % de hRBC mediante inyección ("control con adiciones" (FIG: 7A y datos no mostrados). El aumento exponencial de parasitemia se observó mediante tinción de Giemsa y PCR cuantitativa (FIG. 7B). Esto indica que SupER-G injertados, tratados con clodronato producen una cantidad suficiente de glóbulos rojos humanos para mantener una infección con *P. falciparum*. A partir de esto, se esperó que la infección *in vivo* de ratones injertados con dosis de clodronato con merozoitos de *P. falciparum* y *P. vivax* sería exitosa.

Ejemplo 5

Los ratones TIES (Rag2^{-/-}Il2rg^{null}Tpo^{h/h}Il3/Gmcsf^{h/h}Epo^{h/m}SIRPα^{h/h})

Debido a su baja fertilidad, incompetencia de desarrollo y elevada mortalidad, los ratones con Epo^{h/h} no son ideales para su estudio de infección. En su lugar, ratones heterocigoto para el gen de hEPO (es decir, Epo^{h/m}, por ejemplo, los ratones TIES) son completamente capaces de producir eritropoyetina (EPO) y soportar todas las fases de la eritropoyesis. Se logró una mejora adicional en viabilidad de 8-10 semanas a 4 meses reteniendo el gen m-CSF de ratón en el locus del ratón en lugar de sustituyéndolo con M-CSF humana, debido al alto nivel de injerto de células mieloides humanas soportado por la activación del factor de estimulación de colonias de macrófagos humano (M-CSF) provoca la destrucción de glóbulos rojos de ratón lo que lleva a anemia y muerte de los ratones injertados.

Como los ratones SupER-G, los ratones TIES soportan eritropoyesis humana y mantienen una frecuencia de un 1 % de células eritroides humanas en la sangre periférica si se dosifican con clodronato. Además, la mayoría de células eritroides humanas en la periferia después del tratamiento con clodronato fueron reticulocitos (CD71+). Esto sugiere que estos ratones serían buenos candidatos para soportar la infección de *P. vivax*.

Se demostró que los ratones TIES injertados pueden mantener una frecuencia de un 1 % de células eritroides humanas en la sangre periférica si se dosifican con clodronato. Además, se determinó la capacidad de los ratones TIES en soportar una transfusión de RBC humanos. Tal como se muestra en la FIG. 8, el tratamiento de clodronato estabilizó la población transfundida en más del 20 % de la población total de células en la periferia. Estos niveles, realizados a aproximadamente 4 horas después de su transfusión, se mantuvieron al menos 12 horas después de su transfusión. Se espera que estas frecuencias de RBC serán suficientes para soportar una infección *in vivo* de *Plasmodium* de distintas especies.

Lo anterior simplemente ilustra los principios de la invención. Se apreciará que los expertos en la técnica podrán diseñar diversas disposiciones que, aunque no se describen explícitamente o se muestran en el presente documento, representan los principios de la invención. Adicionalmente, todos los ejemplos y el lenguaje condicional citados en el presente documento pretenden principalmente servir de ayuda al lector en la comprensión de los principios de la invención y los conceptos aportados por los inventores para fomentar la técnica, y deben interpretarse sin limitación a tales ejemplos y condiciones específicamente citados. Por otra parte, todas las afirmaciones en el presente documento que citan principios, aspecto y realizaciones de la invención así como ejemplos específicos de las mismas, están previstos para englobar equivalentes tanto estructurales como funcionales de los mismos. Adicionalmente, se prevé que tales equivalentes incluyen equivalentes tanto actualmente conocidos como equivalentes que se desarrollarán en el futuro, es decir, cualquier elemento desarrollado que realice la misma función, independientemente de la estructura. El alcance de la presente invención, por lo tanto, no pretende limitarse a las realizaciones a modo de ejemplo mostradas y descritas en el presente documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
 Universidad Yale
 Institute for Research in Biomedicine (IRB)
 Murphy, Andrew J
 Stevens, Sean
 Flavell, Richard
 Manz, Markus Gabriel

ES 2 718 732 T3

Shan, Liang

<120> ANIMALES HUMANOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS QUE EXPRESAN EPO HUMANA

5 <130> REGN-013WO

<150> US62/000.460

<151> 19/05/2014

10 <160> 19

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 715

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

20 <400> 1

```

gatgaagact tgcagcgtgg aactggccc agccccgggt cgctaaggag ctccggcagc      60
taggcgcgga gatgggggtg cccgaacgtc ccaccctgct gcttttactc tccttgctac      120
tgattcctct gggcctccca gtctctgtg ctccccacg cctcatctgc gacagtcgag      180
ttctggagag gtacatctta gaggccaagg aggcagaaaa tgtcacgatg ggttgtgcag      240
aagggtcccag actgagtgaa aatattacag tcccagatac caaagtcaac ttctatgctt      300
ggaaaagaat ggaggtggaa gaacaggcca tagaagtttg gcaaggcctg tccctgctct      360
cagaagccat cctgcaggcc caggccctgc tagccaattc ctcccagcca ccagagaccc      420
ttcagcttca tatagacaaa gccatcagtg gtctacgtag cctcacttca ctgcttcggg      480
tactgggagc tcagaaggaa ttgatgtcgc ctccagatac caccacacct gctccactcc      540
gaacactcac agtggatact ttctgcaagc tcttccgggt ctacgccaac ttctccggg      600
ggaaactgaa gctgtacacg ggagaggtct gcaggagagg ggacaggtga catgctgctg      660
ccaccgtggt ggaccgacga acttgctccc cgtcactgtg tcatgccaac cctcc      715

```

25 <210> 2

<211> 192

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

30 <400> 2

```

Met Gly Val Pro Glu Arg Pro Thr Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu
1           5           10           15

```

ES 2 718 732 T3

Leu Ile Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Cys Ala Pro Pro Arg Leu Ile
 20 25 30

Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Ile Leu Glu Ala Lys Glu Ala
 35 40 45

Glu Asn Val Thr Met Gly Cys Ala Glu Gly Pro Arg Leu Ser Glu Asn
 50 55 60

Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met
 65 70 75 80

Glu Val Glu Glu Gln Ala Ile Glu Val Trp Gln Gly Leu Ser Leu Leu
 85 90 95

Ser Glu Ala Ile Leu Gln Ala Gln Ala Leu Leu Ala Asn Ser Ser Gln
 100 105 110

Pro Pro Glu Thr Leu Gln Leu His Ile Asp Lys Ala Ile Ser Gly Leu
 115 120 125

Arg Ser Leu Thr Ser Leu Leu Arg Val Leu Gly Ala Gln Lys Glu Leu
 130 135 140

Met Ser Pro Pro Asp Thr Thr Pro Pro Ala Pro Leu Arg Thr Leu Thr
 145 150 155 160

Val Asp Thr Phe Cys Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ala Asn Phe Leu Arg
 165 170 175

Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Val Cys Arg Arg Gly Asp Arg
 180 185 190

<210> 3
 <211> 1340
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3

cccgagccg gaccggggcc accgcgccc ctctgctccg acaccgcgcc ccctggacag 60

ccgccctctc ctccaggccc gtggggctgg ccctgcaccg ccgagcttcc cgggatgagg 120

gccccgggtg tggtcacccg gcgcgccccca ggtcgctgag ggaccccggc caggcgcgga 180

gatgggggtg cacgaatgtc ctgcctggct gtggcttctc ctgtccctgc tgtcgctccc 240

tctgggcctc ccagtctctg gcgccccacc acgcctcctc tgtgacagcc gaggctctgga 300

gaggtacctc ttggaggcca aggaggccga gaatatcacg acgggctgtg ctgaacactg 360

5

10

ES 2 718 732 T3

cagcttgaat gagaatatca ctgtcccaga caccaaagtt aatttctatg cctggaagag 420
gatggaggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcgggaagc 480
tgtcctgctg ggccaggccc tgttggtcaa ctcttcccag ccgtgggagc ccctgcagct 540
gcatgtggat aaagccgtca gtggccttcg cagcctcacc actctgcttc gggctctggg 600
agcccagaag gaagccatct cccctccaga tgcggcctca gctgctccac tccgaacaat 660
cactgctgac actttccgca aactcttccg agtctactcc aatttcctcc ggggaaagct 720
gaagctgtac acaggggagg cctgcaggac aggggacaga tgaccagggtg tgtccacctg 780
ggcatatcca ccacctccct caccaacatt gcttgtgcca caccctcccc cgccactcct 840
gaaccccgtc gaggggctct cagctcagcg ccagcctgtc ccatggacac tccagtgcc 900
gcaatgacat ctcaggggccc agaggaactg tccagagagc aactctgaga tctaaggatg 960
tcacagggcc aacttgaggg cccagagcag gaagcattca gagagcagct ttaaactcag 1020
ggacagagcc atgctgggaa gacgcctgag ctactcggc accctgcaaa atttgatgcc 1080
aggacacgct ttggaggcga tttacctgtt ttcgcaccta ccatcagga caggatgacc 1140
tggagaactt aggtggcaag ctgtgacttc tccaggtctc acgggcatgg gcactccctt 1200
ggtggcaaga gcccccttga caccggggtg gtgggaacca tgaagacagg atgggggctg 1260
gcctctggct ctcatgggggt ccaagttttg tgtattcttc aacctcattg acaagaactg 1320
aaaccaccaa aaaaaaaaaa 1340

<210> 4
<211> 193
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 4

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu

10

ES 2 718 732 T3

					85					90					95			
	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	Asn	Ser	Ser		
				100					105					110				
	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ser	Gly		
			115					120					125					
	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu		
		130					135					140						
	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Ile		
	145					150					155					160		
	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu		
					165					170					175			
	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	Cys	Arg	Thr	Gly	Asp		
				180					185					190				

Arg

5	<210> 5	
	<211> 226	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> secuencia de polinucleótidos sintética	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(115)	
	<223> Secuencia de ratón	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (116)..(128)	
	<223> Exón humano 1	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (116)..(226)	
	<223> Secuencia humana	
30	<400> 5	
	tcttccaggc tagtgggggtg atctggccct acagaacttc caaggatgaa gacttgcagc	60
	gtggacactg gccagcccc gggtcgctaa ggagctccgg cagctaggcg cggagatggg	120
	gggtgcacggt gactactcgc gggctgggcg ctcccgcccg cccgggtccc tgtttgagcg	180
	gggatttagc gcccgggcta ttggccagga ggtggctggg ttcaag	226
30	<210> 6	

ES 2 718 732 T3

<211> 1054
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> secuencia de polinucleótidos sintética

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(115)
 <223> Exón humano 5

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(926)
 <223> Secuencia humana

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (927)..(1054)
 <223> extremo 5' de casete de selección

<400> 6

actccgaaca atcactgctg acactttccg caaactcttc cgagtctact ccaatttccct	60
ccggggaaag ctgaagctgt acacagggga ggcctgcagg acaggggaca gatgaccagg	120
tgtgtccacc tgggcatatc caccacctcc ctcaccaaca ttgcttgtgc cacaccctcc	180
cccgccactc ctgaaccccg tcgaggggct ctcagctcag cgccagcctg tcccatggac	240
actccagtgc cagcaatgac atctcagggg ccagaggaac tgtccagaga gcaactctga	300
gatctaagga tgtcacaggg ccaacttgag ggcccagagc aggaagcatt cagagagcag	360
ctttaaactc agggacagag ccatgctggg aagacgcctg agctcactcg gcaccctgca	420
aaatttgatg ccaggacacg ctttggaggc gatttacctg ttttcgcacc taccatcagg	480
gacaggatga cctggagaac ttaggtggca agctgtgact tctccaggtc tcacgggcat	540
gggcactccc ttggtggcaa gagccccctt gacaccgggg tgggtgggaac catgaagaca	600
ggatgggggc tggcctctgg ctctcatggg gtccaagttt tgtgtattct tcaacctcat	660
tgacaagaac tgaaccacc aatatgactc ttggcttttc tgttttctgg gaacctccaa	720
atcccctggc tctgtcccac tcctggcagc agtgcagcag gtccaggtcc gggaaacgag	780
gggtggaggg ggctgggcc tacgtgctgt ctcacacagc ctgtctgacc tctcgaccct	840
accgggcctg aggccacaag ctctgcctac gctgggtcaat aaggtgtctc cattcaaggc	900
ctcaccgcag taaggcagct gccaacctcg agataacttc gtataatgta tgctatacga	960
agttatatgc atggcctccg cgccgggttt tggcgcctcc cgcgggcgcc cccctcctca	1020
25 cggcgagcgc tgccacgtca gacgaagggc gcag	1054

<210> 7
 <211> 243
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

	<220>		
	<223> secuencia de polinucleótidos sintética		
5	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (1)..(121)		
	<223> extremo 3' de casete de selección		
10	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (122)..(243)		
	<223> Secuencia de ratón		
15	<400> 7		
	gcctctgttc cacatacaact tcattctcag tattgttttg ccaagttcta attccatcag	60	
	acctcgacct gcagccccta gataacttcg tataatgtat gctatacgaa gttatgctag	120	
	cgccaaccgg ctaggacaag tgctgagtga gctggggcca ccgtttgagg aacaggagc	180	
	cagtacagag gggttcccct ttaggggttg gtggcaatgg gcgaccctgg ttaatggatc	240	
	att	243	
20	<210> 8		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> secuencia de polinucleótidos sintética		
	<400> 8		
	catctgcgac agtctgagttc	20	
30	<210> 9		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> secuencia de polinucleótidos sintética		
	<400> 9		
	ccagggagct taccgtgac	19	
40	<210> 10		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> secuencia de polinucleótidos sintética		
	<400> 10		
	aggtacatct tagaggccaa ggaggca	27	
50	<210> 11		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> secuencia de polinucleótidos sintética		

	<400> 11 acagccgagt cctggagag	19
5	<210> 12 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> secuencia de polinucleótidos sintética	
	<400> 12 aagccctgag cgtgagttc	19
15	<210> 13 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> secuencia de polinucleótidos sintética	
25	<400> 13 aggccaagga ggccgagaat atcacg	26
30	<210> 14 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> secuencia de polinucleótidos sintética	
35	<400> 14 gagccctgca ctggacaac	19
40	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> secuencia de polinucleótidos sintética	
45	<400> 15 tcccatgaac gctgagagtc	20
50	<210> 16 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> secuencia de polinucleótidos sintética	
55	<400> 16 agggtcaagg agccatagac agaatggc	28
60	<210> 17 <211> 200 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> secuencia de polinucleótidos sintética	

ES 2 718 732 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(100)
 <223> Secuencia de ratón
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (101)..(200)
 <223> Secuencia humana
 10

<400> 17
 agctctccta ccaactagact gctgagaccc gctgctctgc tcaggactcg atttccagta 60
 cacaatctcc ctctttgaaa agtaccacac atcctgggggt gctcttgcatt ttgtgtgaca 120
 ctttgctagc caggctcagt cctggggtcc aggtggggac tcaaacacac tggcaccgagt 180
 ctacattgga tattcttggg 200

15 <210> 18
 <211> 199
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> secuencia de polinucleótidos sintética

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(100)
 <223> extremo 5' de casete de neomicina

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (101)..(199)
 <223> Secuencia humana

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (106)..(139)
 <223> LoxP

<400> 18
 gctccccatt cctcactggc ccagcccctc ttccctactc tttctagccc ctgcctcatc 60
 tccctgggctg ccattggggag cctgccccac tgggaagccag tcgagataac ttcgtataat 120
 gtatgctata cgaagttata tgcattggcct ccgcgccggg ttttggcgcc tcccgcgggc 180
 40 gccccctcc tcacggcga 199

45 <210> 19
 <211> 200
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de polinucleótidos sintética

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(100)
 <223> 3' de casete de neomicina

ES 2 718 732 T3

<220>
<221> misc_feature
<222> (101)..(200)
<223> Exón humano 4

5

<400> 19

```
cattctcagt attgttttgc caagttctaa ttccatcaga cctcgacctg cagcccctag      60
ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatgctagc tgtctcatag aggctggcga      120
tctggctcag ggacagccag tactgcaaag agtatccttg ttcatacctt ctctagtgg      180
ccatctccct gggacagtca                                          200
```

REIVINDICACIONES

1. Un roedor modificado genéticamente, que comprende:
una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de eritropoyetina humana (hEPO),
5 en donde el ácido nucleico está unido operativamente a un promotor del gen de la eritropoyetina (EPO) endógeno en el locus del gen de EPO de roedor, en donde la unión operativa da como resultado una mutación nula en el gen de EPO de roedor en el locus del gen EPO de roedor y en donde el roedor expresa proteínas humanas adicionales seleccionadas entre el grupo que consiste en:
10 una proteína hM-CSF codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de *M-csf* en donde el promotor de *M-csf* es un promotor de *M-csf* de roedor endógeno en el locus del gen de *M-csf* de roedor y en donde el roedor es heterocigoto nulo u homocigoto nulo para el gen de *M-csf* de roedor,
una proteína de hIL3 codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de *Il-3* en donde el promotor de *Il-3* es un promotor de *Il-3* de roedor endógeno en el locus del gen de *Il-3* de roedor y en donde el roedor es
15 heterocigoto nulo u homocigoto nulo para el gen de *Il-3* de roedor,
una proteína de hGM-CSF codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de *Gm-csf* en donde el promotor de *Gm-csf* es un promotor de *Gm-csf* de roedor endógeno en el locus del gen de *Gm-csf* de roedor y en donde el roedor es heterocigoto nulo u homocigoto nulo para el gen de *Gm-csf* de roedor,
20 una proteína de hTPO codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de *TPO* en donde el promotor de *TPO* es un promotor de *TPO* de roedor endógeno en el locus del gen de *TPO* de roedor y en donde el roedor es heterocigoto nulo u homocigoto nulo para el gen de *TPO* de roedor, y
una proteína de hSirpa codificada por un ácido nucleico bajo el control de un promotor de *Sirpa* en donde el promotor de *Sirpa* es un promotor de *Sirpa* de roedor endógeno en el locus del gen de *Sirpa* de roedor y en donde el roedor es heterocigoto nulo u homocigoto nulo para el gen de *Sirpa* de roedor,
25 en donde las proteínas humanas incluyen al menos hTPO, hIL3, hGM-CSF y hSirpa, y en donde el roedor es inmunodeficiente y la inmunodeficiencia es causada por una deficiencia tanto de Rag2 como de Il2rg.
2. El roedor de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el roedor es heterocigótico para el alelo que comprende la
30 secuencia de ácidos nucleicos que codifica la hEPO.
3. El roedor de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el roedor es homocigótico para el alelo que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la hEPO.
- 35 4. El roedor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la hEPO comprende secuencia codificante y no codificante genómica de EPO humana.
5. El roedor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la hEPO comprende secuencia de ADNc EPO humana.
- 40 6. El roedor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el roedor es un ratón.
7. El roedor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el roedor comprende
45 adicionalmente un injerto de células hematopoyéticas humanas.
8. El roedor de acuerdo con la reivindicación 7, en donde las células hematopoyéticas humanas comprenden una o más células seleccionadas entre el grupo que consiste en células CD34 positivas humanas, una célula madre hematopoyética humana, una célula precursora mieloide humana, una célula precursora eritroide humana, una célula mieloide humana, una célula dendrítica humana, un monocito humano, un granulocito humano, un eritrocito humano, un neutrófilo humano, un mastocito humano, un timocito humano y un linfocito B humano.
- 50 9. El roedor de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el roedor comprende clodronato.
10. El roedor de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el roedor comprende adicionalmente una infección con un
55 patógeno que se dirige a células humanas del linaje eritroide.
11. El roedor de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el patógeno se selecciona entre *Plasmodium* sp., *Babesia* sp. y *Theileri* sp.

```

MEPO 1  MGVPERPIL-LL-LLLSLLIPIGLPVLCAPRLLCHSRVLERYLL-AKBAENVIMCCALCPRLSEALIVPDIKVNFYAWKRMBVEE-QALVMOG-SLLSEA 99
LEPO 1  MGVHECPAWLWLLLSLLISLPIGLPVLCAPRLLCHSRVLERYLL-AKBAENITVCCAEHCSTLNEKTVVPTIKVNFYAWKRMBV3QAVVMOG-ALLSEA 100

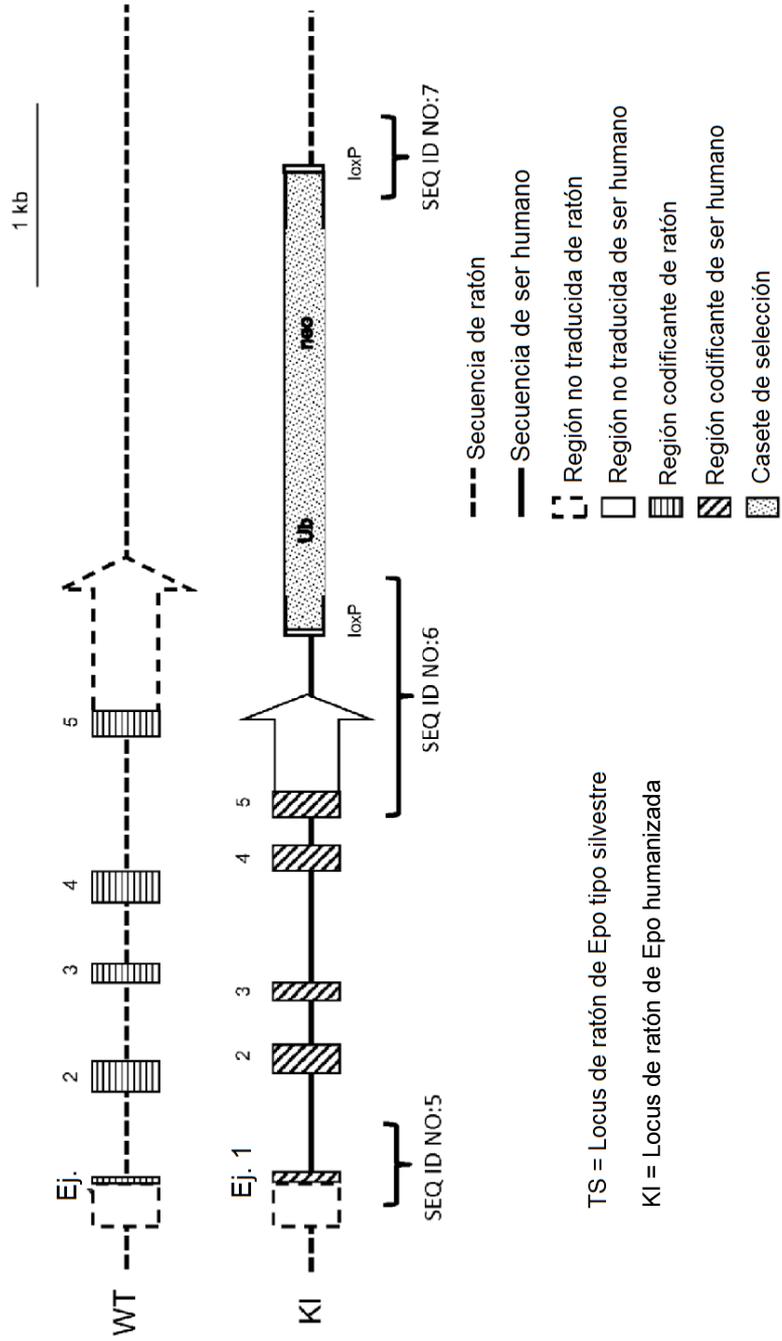
MEPOO 100  LLCAQALLANSSCPPEITLQHLIDKAI SGLRS-ITSL-SVLGAQKELMSPPLE-TPPAFRLRI_VDIKCKLFRVYANFLHGKLIK_YIGEVCKRGLR 192
LEPO 101  VLRQYALLVNSSCPWEPLGLHVDRKAVSCTLRSLTILRALGQREAI SPPDAASAAPLRTITADTRKLFVRVYSNPLRCKLKIYTCGACRTQDR 193

MEPO (SEQ ID NO:2)
LEPO (SEQ ID NO:4)

```

FIG. 1

Esquema de humanización de EPO



TS = Locus de ratón de Epo tipo silvestre

KI = Locus de ratón de Epo humanizada

FIG. 2

Alelo de activación de hEPO

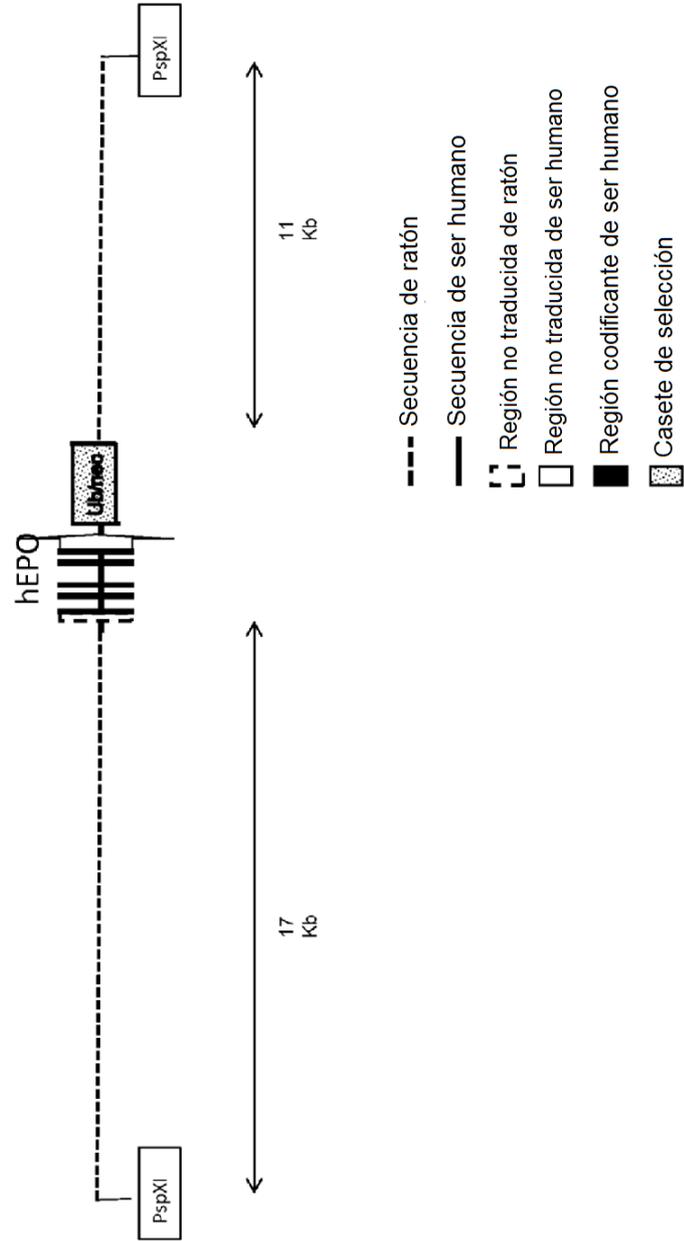


FIG. 3

Esquema de humanización de Sirpa

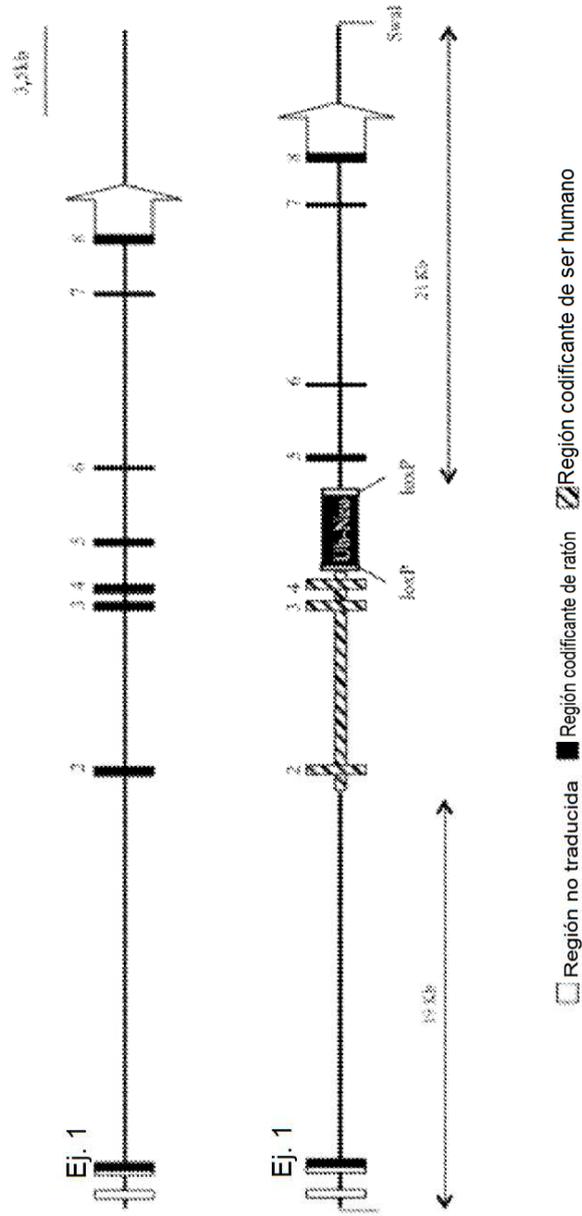


FIG. 4

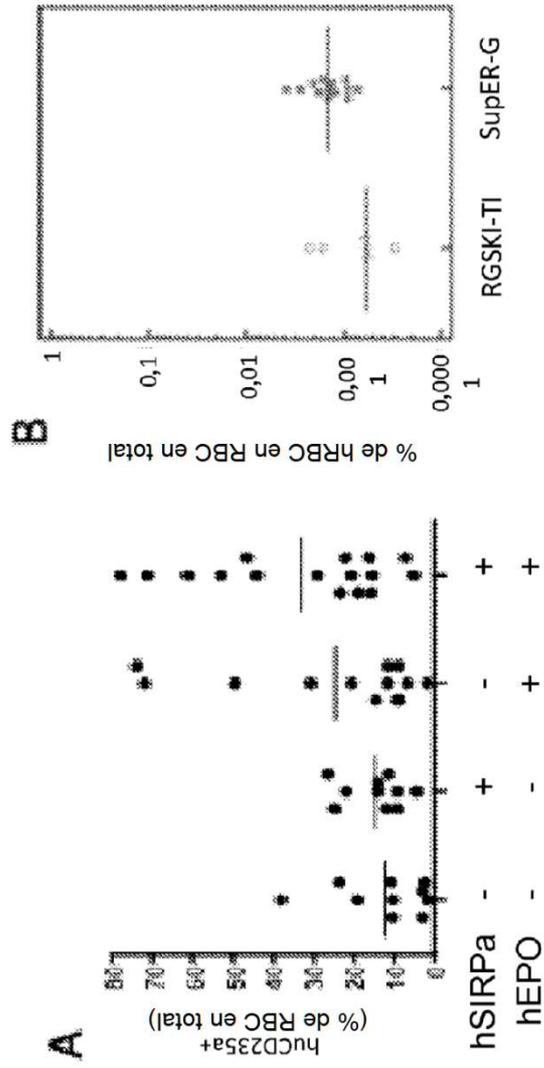


FIG. 5

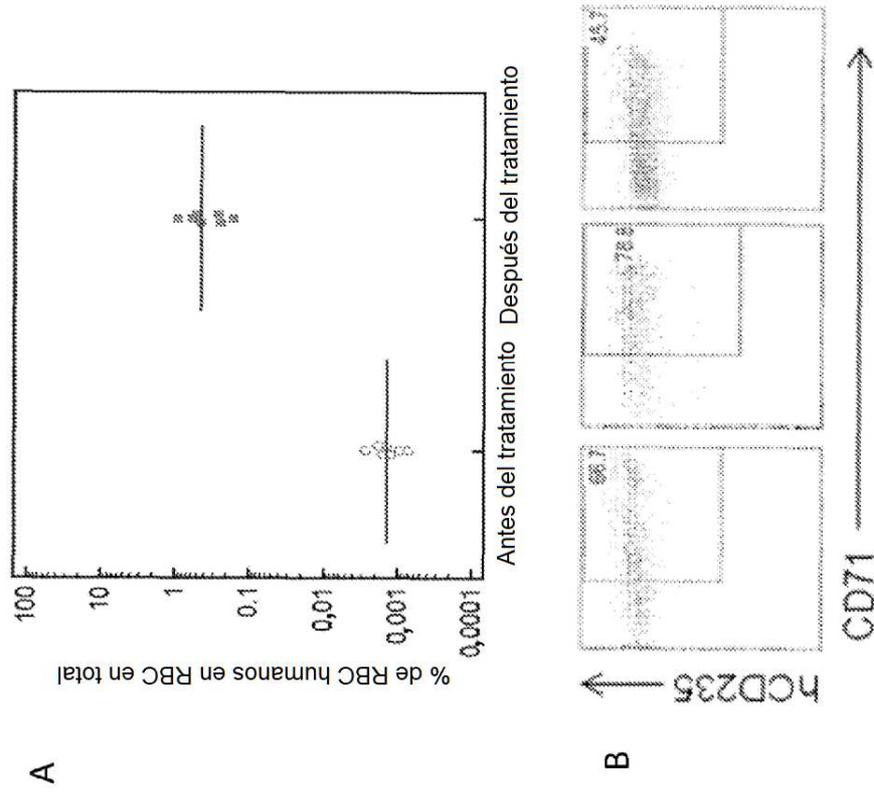


FIG. 6

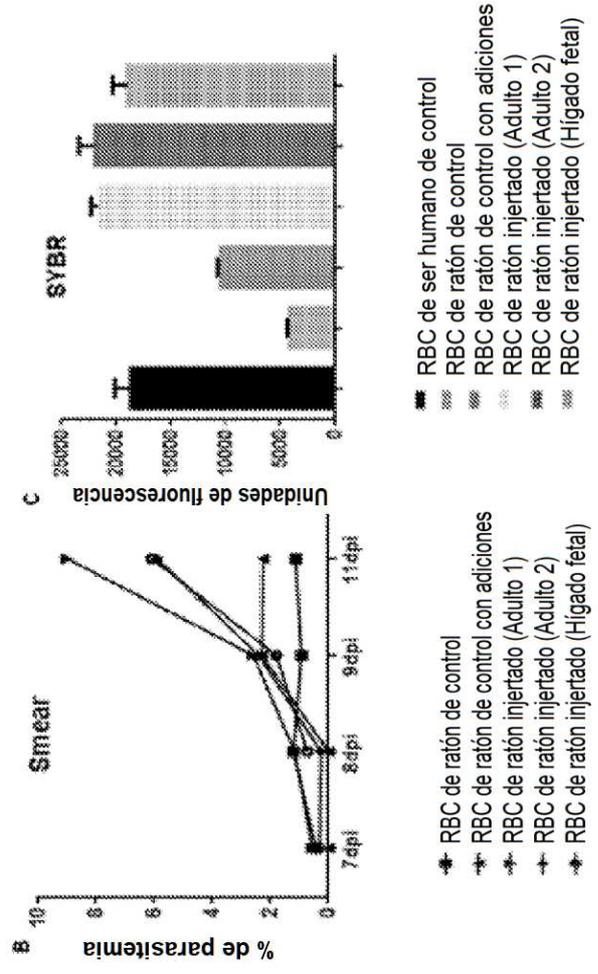
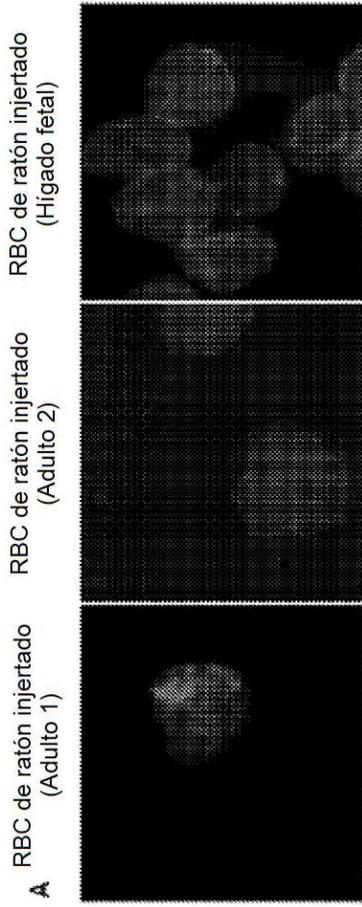


FIG. 7

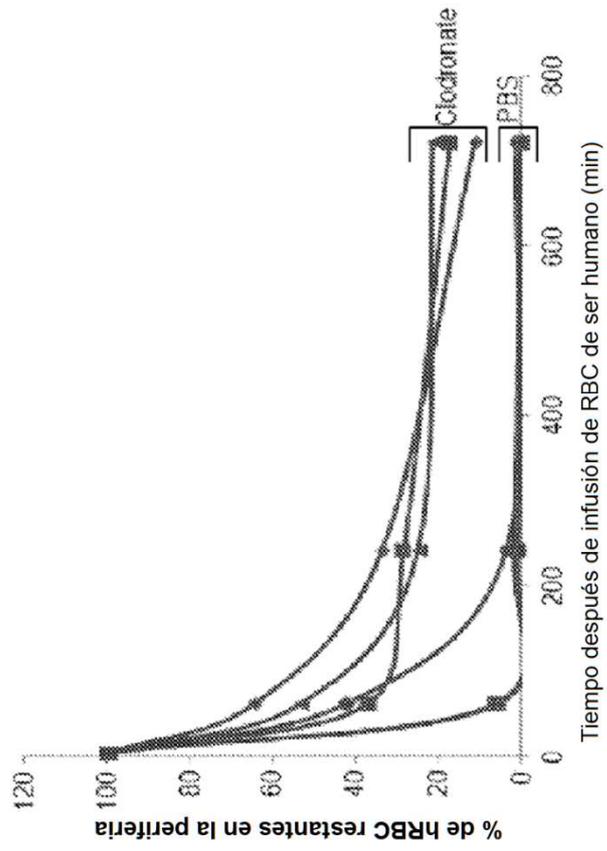


FIG. 8