(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 817 792**

(51) Int. CI.:

C12N 15/85 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2010 PCT/US2010/029800**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.10.2010 WO10115115**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2010 E 10712666 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 2414523**

(54) Título: **Ratones con un sistema inmunitario humanizado con células dendríticas reforzadas**

(30) Prioridad:

03.04.2009 US 166697 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2021

(73) Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cedex 13, FR y
INSTITUT PASTEUR (50.0%)

(72) Inventor/es:

DI SANTO, JAMES y
MENTION, JEAN-JACQUES

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

DESCRIPCIÓN

Ratones con un sistema inmunitario humanizado con células dendríticas reforzadas

1. Introducción

La presente invención se refiere a un sistema de modelo de animal transgénico basado en el desarrollo de ratones transgénicos que llevan componentes del sistema inmunitario humano. Específicamente, la invención se refiere a un ratón transgénico $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ deficiente en Flk2 y al injerto en dicho ratón de células madre hematopoyéticas humanas. La presente invención proporciona además métodos para aumentar el número de células dendríticas humanas funcionalmente competentes y las células diana hematopoyéticas con las que interaccionan en dicho ratón transgénico por la administración de Flk2L. El sistema de modelo de animal transgénico de la invención se puede usar para ensayar candidatos a vacunas humanas, para el cribado de potenciales inmunoadyuvantes y para desarrollar nuevos medicamentos.

2. Antecedentes de la invención

Las células dendríticas (DC) derivan de células madre hematopoyéticas (HSC) y se desarrollan bajo la influencia de factores de crecimiento definidos. Las DC tienen una función esencial en el inicio de las respuestas inmunitarias y en asegurar la tolerancia inmunitaria periférica. No obstante, se desconocen los mecanismos que generan estos resultados biológicos. Además, actualmente hay disponibles pocos modelos de animales pequeños para estudiar la biología de las DC humanas in vivo.

Se pueden generar ratones con sistema inmunitario humano (HIS) que albergan las tres clases de linfocitos humanos (células B, T, NK) después de la transferencia de HSC $CD34^+$ humanas a ratones Balb/c $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ recién nacidos. Aunque se observan DC humanas en ratones con HIS, su desarrollo parece subóptimo y su homeostasis puede estar alterada, posiblemente debido a la competencia con DC endógenas de ratón que se desarrollan normalmente en estos receptores. Como resultado, las respuestas de DC en ratones con HIS son principalmente de origen de ratón. Dado que las DC humanas y de ratón responden de forma diferente durante las respuestas inmunitarias, sería ventajoso un modelo de ratón con HIS con un compartimento de DC de ratón mínimo y un compartimento de DC humanas máximo.

Con el fin de abordar estas deficiencias, la presente invención proporciona un modelo de ratón con HIS mejorado que compromete el desarrollo de las DC de ratón endógenas y permite el desarrollo preferencial de las DC humanas. Los ratones con HIS generados en esta nueva cepa receptora, usando un protocolo de refuerzo de citoquinas exógenas, desarrollan células B, T y NK humanas, pero muestran un desarrollo mejorado de DC humanas (incluyendo tanto las DC $CD11c^+$ clásicas como las DC plasmocitoides $CD123^+$). Además, se podían identificar porcentajes mayores de células mieloides $CD15^+CD33^+$ humanas y monocitos $CD14^+$ y macrófagos en el bazo y la médula ósea de ratones trasplantados. Las DC humanas identificadas en estos ratones con HIS eran citoquinas productoras, funcionales y factores inflamatorios solubles después de estimulación de TLR. Las DC humanas aumentadas también mejoraban el número de células NK y T humanas en los ratones con HIS receptores.

3. Sumario de la invención

Se describe en la presente memoria un sistema de modelo murino que comprende ratones $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ deficientes en Flk2. Se describen además en la presente memoria los ratones $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ deficientes en Flk2 con células madre hematopoyéticas humanas injertadas. La invención está relacionada con un ratón deficiente para el gen activador de recombinación 2 (Rag2) y/o el gen activador de recombinación 1 (Rag1), cadena gamma del receptor de interleuquina-2 (γc) y quinasa de hígado fetal 2 (Flk2) que comprende una alteración en el(los) gen(es) Rag1 y/o Rag2, en el gen γc y el gen Flk2, (i) con células progenitoras hematopoyéticas humanas injertadas, y al que se administra ligando de la quinasa 2 de hígado fetal humano exógeno (Flk2L).

Se describen además en la presente memoria métodos para aumentar el número de células dendríticas humanas funcionalmente competentes, y las células diana hematopoyéticas con las que interaccionan, mediante la administración de factores de crecimiento exógenos. Preferiblemente, en los métodos descritos antes, el factor de crecimiento exógeno es el ligando de la quinasa 2 de hígado fetal (Flk2L; también denominado Flt3L). Los ratones con HIS generados usando este nuevo procedimiento albergan números mayores de DC humanas funcionales, células mieloides, NK y T y proporcionan una nueva herramienta para estudiar la biología de las DC humanas en la salud y la enfermedad. Por consiguiente, el sistema de modelo murino de la invención proporciona un medio nuevo para examinar in vivo la eficacia y los potenciales inconvenientes de candidatos de vacunas y para evaluar nuevos adyuvantes que pueden modificar las respuestas inmunitarias. De esta forma, los ratones con HIS que portan mejores números de DC humanas funcionales se pueden usar como una plataforma de cribado para inmunomoduladores que actúan directamente en las DC o indirectamente en las células T y células NK a través de las DC. La invención también proporciona un nuevo sistema de modelo de animal transgénico para investigar mecanismos de subversión inmunitaria patógena que operan in vivo por modificación de la función de las DC humanas y que dan como resultado una respuesta inmunitaria alterada, sea aumentada o disminuida, contra el patógeno. La invención se refiere además al uso de dicho sistema modelo para cribar, o identificar, compuestos que modulan (aumentan o disminuyen) el número y/o la actividad de las DC. Dichos compuestos se pueden usar en inmunoterapias para el tratamiento de enfermedades

patógenas, cáncer, enfermedades autoinmunitarias, infecciosas e inflamatorias y para el tratamiento de pacientes trasplantados.

4. Breve descripción de los dibujos

Figura 1A-B. Modelo de ratón $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ deficiente en Flk2. Figura 1A. Información crítica relativa a las funciones biológicas del receptor Flk2/Flt3 y su ligando (Flk2L/Flt3L) como se observa en ratones $Flk2^{-/-}$ y ratones tratados con Flk2L. B) Estrategia experimental usada para obtener ratones con HIS "reforzados con DC". Los ratones receptores son ratones $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ deficientes en Flk2 en el contexto de Balb/c. A los receptores recién nacidos se les inyecta células madre hematopoyéticas (HSC) $CD34^+$ humanas y posteriormente se tratan con Flk2L exógeno. Se puede usar Flk2L de ratón o humano para reforzar las células dendríticas humanas (DC).

Figura 2. DC de ratón reducidas en ratones $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}Flk2^{-/-}$. Análisis de DC de ratón en bazos de ratones $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ adultos frente a ratones $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}Flk2^{-/-}$ que se han tratado bien con PBS o Flk2L de ratón exógeno durante dos semanas. Las células mieloides $CD11b^+$ murinas y células dendríticas $CD11c^+$ se reducen en ratones $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}Flk2^{-/-}$ tratados con PBS en comparación con ratones $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ tratados con PBS. Se observa aumento de células $CD11b^+$ y $CD11c^+$ en ratones $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ que reciben Flk2L de ratón exógeno pero no en ratones $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}Flk2^{-/-}$. En este experimento, el Flk2L de ratón se proporcionó por implante subcutáneo de células de melanoma B16 que se habían transfectado con ADNc de longitud completa que codifica Flk2L de ratón. Se obtuvieron resultados similares usando proteína de fusión Flk2L humano-Ig recombinante (disponible de BioXcell Inc.) proporcionando 10 ug/ratón, 3 veces por semana durante 2 semanas.

Figura 3A-B. Se desarrollan más DC humanas en ratones con HIS hechos en receptores $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ deficientes en Flk2. Figura 3 A. Análisis de células dendríticas plasmacitoides (pDC) $CD123^+$ humanas y células dendríticas convencionales (cDC) $CD11c^+$ humanas en el bazo de ratones con HIS generadas en receptores $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ frente a receptores $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}Flk2^{-/-}$ que han recibido (+ Flk2L exo) o no han recibido Flk2L humano recombinante exógeno (5 ug/ratón; 3 veces por semana durante 2 semanas). Los porcentajes de pDC y cDC humanos están en recuadros. Figura 3B) Cuantificación de subconjuntos de DC humanas en ratones con HIS generados en receptores $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ frente a receptores $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}Flk2^{-/-}$ que han recibido (+ Flk2L exo) o no han recibido Flk2L humano recombinante exógeno (5 ug/ratón; 3 veces por semana durante 2 semanas). Se muestran los números absolutos de subconjuntos de DC del bazo y células B $CD19^+$.

Figura 4. Función de DC humanas mejorada en ratones con HIS "reforzados con DC". Se aislaron esplenocitos de ratones con HIS hechos en los receptores indicados y se cultivaron durante 24 horas en presencia de los ligandos de TLR indicados (concentración final 5-20 ug/ml). Los factores solubles de origen humano secretados en el líquido sobrenadante del cultivo se detectaron y cuantificaron usando tecnología de Luminex. Obsérvese que el IFN-α humano normalmente es producido por pDC en respuesta a CpG y esto ocurre solo en ratones con HIS reforzados con DC. De manera similar, las cDC producen IL-12 en respuesta a R848 (un ligando de TLR7/8) en ratones HIS reforzados con DC.

Figura 5. Las células NK humanas aumentan en ratones con HIS "reforzados con DC". Se generaron ratones con HIS en los receptores indicados como se describe en la Figura 3. Las células NK $CD56^+CD3^-$ se contaron en el bazo, el timo y la médula ósea (BM).

5. Descripción detallada de la invención

La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes. La presente invención se refiere a ratones $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}Flk2^{-/-}$ que se pueden usar como hospedantes receptores para el trasplante de precursores hematopoyéticos humanos, para generar nuevas quimeras humano/ratón que tienen características únicas relacionadas con el desarrollo y las capacidades funcionales de los subconjuntos de DC humanas. Los ratones de la invención representan un modelo completamente humanizado, fácil de desarrollar, que se puede usar para estudiar el desarrollo y la regulación del sistema inmunitario humano in vivo. Los ratones de la invención proporcionan un modelo útil en el desarrollo y optimización de vacunas o inmunoterapias con máxima eficacia in vivo para uso humano. Específicamente, dichos ratones permiten un análisis completo de los componentes de la respuesta inmunitaria a un antígeno humano (patógeno, tumor, autoantígeno) en un solo animal, así como una evaluación de la protección conferida específicamente por vacunación frente a un desafío antigénico. También es posible estudiar cómo cooperan estas respuestas. Por tanto, este modelo es útil para desarrollar inmunoterapias profilácticas o curativas más eficaces contra patógenos humanos, cáncer y enfermedades autoinmunitarias. Los ratones de la invención representan una herramienta optimizada para estudios de inmunología básica y aplicada.

Definiciones

- "deficiencia en" se refiere a la falta de una función molecular o celular.

- "mutación" se refiere a la sustitución, inserción, eliminación de uno o más nucleótidos en una secuencia de polinucleótido.

- "gen deficiente", "gen inactivado", "alelo nulo" se refiere a un gen que comprende una mutación espontánea o dirigida

que da como resultado un producto génico alterado que carece de la función molecular del gen de tipo natural.

- "gen alterado" se refiere a un gen que se ha inactivado usando recombinación homóloga u otros procedimientos conocidos en la técnica.

- "xenogénico", "especie xenogénica" se refiere a un vertebrado que no es ratón.

- $\gamma c^{-/-}$ se refiere a una alteración de la cadena γ del receptor de IL-2

- $Flk2^{-/-}$ se refiere a una alteración del gen de Flk2 (gen de la quinasa 2 de hígado fetal)

- $Rag^{-/-}$ se refiere a una alteración del gen activador de recombinación 1 (Rag1) y/o del gen activador de recombinación 2 (Rag2).

5.1. Sistema de modelo murino

La invención está relacionada con un ratón deficiente para el gen activador de recombinación 2 (Rag2) y/o el gen activador de recombinación 1 (Rag1), cadena gamma del receptor de interleuquina-2 (γc) y quinasa de hígado fetal 2 (Flk2) que comprende una alteración en el(los) gen(es) Rag1 y/o Rag2, en el gen γc y el gen Flk2, con células progenitoras hematopoyéticas humanas injertadas, y al que se administra ligando de la quinasa 2 de hígado fetal humano exógena (Flk2L). Preferiblemente, el Flk2L se ha proporcionado por administración de Flk2L recombinante.

La presente invención se refiere por lo tanto a un sistema de modelo murino basado en el desarrollo de ratones que llevan componentes del sistema inmunitario humano, incluyendo CD humanas. Los ratones según la presente invención comprenden tres genes que están inactivados por una mutación espontánea o una mutación dirigida (genes deficientes). Estas mutaciones que son bien conocidas por los expertos en la técnica incluyen, por ejemplo: una primera mutación que es una alteración del gen activador recombinante Rag1 y/o Rag2 (Mombaerts et al., *Cell*, 1992, 68, 869-877, Takeda et al., *Immunity*, 1996, 5, 217-228), una segunda mutación que es una alteración del gen de la cadena γ del receptor de IL-2 (o cadena γ del receptor de citoquina común (γ_c)) (IL-2R$\gamma^{-/-}$ o $\gamma^{-/-}$; DiSanto et al., 1995, *Proc Natl Acad Sci USA* 92; 377-381), y una tercera mutación que es una alteración del gen Flk2 (Mackarehtschian K et al. 1995 *Immunity* 3: 147-61)

Se conocen ratones mutantes que son $Rag2^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$y $Flk2^{-/-}$ y su preparación y características (Véase Shinkai Y et al. 1992, *Cell* 68: 855; DiSanto JP et al., 1995, *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 377-81; Andersson A et al., 1997, *Eur J Immunol.* 27: 1762-8; y Mackarehtschian K et al., 1995 *Immunity* 3:147-61). En una realización de la invención, las mutaciones se ponen en un contexto genético adecuado. Dichos contextos son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, un contexto de Balb/c. En una realización específica de la invención, el ratón de acuerdo con la presente invención tiene el genotipo $Rag2^{-/-}/\gamma c^{-/-}/Flk2^{-/-}$.

Los métodos para generar animales transgénicos con mutaciones dirigidas y/o expresión transgénica a través de la manipulación de embriones y microinyección, en particular animales tales como ratones, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. Nº 4.736.866 de Leder et al. y patente de EE.UU. Nº 4.870.009 Evans et al., patente de EE.UU. Nº 4.873.191 de Wagner et al., y en Hogan, B., Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

El ratón de la presente invención se puede producir mediante cruces sucesivos de ratones que llevan una o más mutaciones/transgenes de interés como se ha definido antes, y cribado de las progenies hasta que se obtienen mutantes dobles y triples y transgénicos dobles y triples. Los métodos para llevar a cabo dichos cruces sucesivos de ratones son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los ratones de la invención, que llevan una o más de las mutaciones/transgenes de interés deseados, se pueden generar usando recombinación homóloga, que es un planteamiento general para dirigir mutaciones a una secuencia genética deseada preseleccionada de una célula con el fin de producir un animal transgénico (Mansour et al., *Nature*, 1988, 336:348-352; Capecchi, M. R., *Trends Genet*., 1989, 5:70-76; Capecchi, M. R., *Science*, 1989, 244:1288-1292; Capecchi et al., En: *Current Communications in Molecular Biology*, Capecchi, M. R. (Ed.), *Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor*, N.Y. (1989), pág. 45-52; Frohman et al., *Cell*, 1989, 56:145-147). El direccionamiento de genes implica el uso de técnicas de ADN recombinante convencionales para introducir una mutación deseada en una secuencia de ADN clonada de un locus elegido. Con el fin de usar el método de "direccionamiento de genes", el gen de interés debe haber sido previamente clonado y determinados los límites intrón-exón. El método da como resultado la inserción de un gen marcador (p. ej., un gen nptl1) en una región traducida de un gen de interés particular. Por tanto, el uso del método de direccionamiento de genes da como resultado la destrucción grave del gen de interés. Significativamente, el uso del direccionamiento de genes para alterar un gen de una célula da como resultado la formación de una alteración grave en la secuencia de ese gen. La mutación entonces es transferida por recombinación homóloga al genoma de una célula madre derivada de embrión (ES) pluripotente. Las células madre alteradas se microinyectan en blastocistos de ratón y se incorporan al embrión de ratón en desarrollo para finalmente convertirse en animales quiméricos. En algunos casos, las células de la línea germinal de los animales quiméricos se obtendrán

de las células ES genéticamente alteradas, y los genotipos mutantes se pueden transmitir mediante reproducción.

Las células animales quiméricas o transgénicas se pueden preparar introduciendo una o más moléculas de ADN en una célula, que puede ser una célula pluripotente precursora, tal como una célula ES, o equivalente (Robertson, E. J., En: *Current Communications in Molecular Biology*, Capecchi, M. R. (Ed.), *Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor*, N.Y. (1989), pág. 39-44. El término "precursor" pretende indicar sólo que la célula pluripotente es un precursor de la célula pluripotente ("transfectada") deseada, que se prepara de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. La célula pluripotente (precursora o transfectada) se puede cultivar in vivo de una manera conocida en la técnica (Evans et al., *Nature*, 1981, 292: 154-156), para formar un animal quimérico o transgénico. Se puede usar cualquier célula ES de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, se prefiere usar aislados primarios de células ES. Dichos aislados se pueden obtener directamente de embriones, tales como la línea celular CCE descrita por Robertson, E.J. (En: *Current Communications in Molecular Biology*, Capecchi, M. R. (Ed.), *Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor*, N.Y. (1989), pág. 39-44), o del aislamiento clonal de células ES de la línea celular CCE (Schwartzberg et al, *Science*, 1989, 246: 799-803). Dicho aislamiento clonal se puede lograr de acuerdo con el método de E.J. Robertson (en: *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, (E J. Robertson, Ed.), IRL Press, Oxford, 1987).

El propósito de dicha propagación clonal es obtener células ES, que tienen una mayor eficacia para diferenciarse en un animal. Las células ES clonalmente seleccionadas son aproximadamente 10 veces más eficaces en la producción de animales transgénicos que la línea celular progenitora CCE. Para los propósitos de los métodos de recombinación de la presente memoria, la selección clonal no proporciona ventajas. Un ejemplo de líneas celulares ES que se han obtenido clonalmente de embriones, son las líneas de células ES, ABI ($hprt^+$) o AB2.1 (hprt"). Las células ES se cultivan preferiblemente en células estromales (tales como células STO (en especial células STO SNC4) y/o células fibroblastos embrionarios primarios) como describe E. J. Robertson *(*En: *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach,* (E. J. Robertson, Ed., IRL Press, Oxford, 1987, pág. 71-112). Describen métodos para la producción y análisis de ratones quiméricos Bradley, A. (En: *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach,* (E. J. Robertson, Ed.), IRL Press, Oxford, 1987, pág. 113-151). Las células estromales (y/o fibroblastos) sirven para eliminar el sobrecrecimiento clonal de células ES anormales. Lo más preferiblemente, las células se cultivan en presencia del factor inhibidor de leucocitos ("LIF") (Gough et al., *Reprod. Fertil. Dev.*, 1989, 1:281-288; Yamamori et al., *Science*, 1989, 246:1412-1416). Puesto que el gen que codifica el LIF se ha clonado (Gough et al., *Reprod. Fertil. Dev.*, 1989, 1:281-288), se prefiere especialmente transformar las células estromales con este gen, mediante medios conocidos en la técnica, y después cultivar las células ES en células estromales transformadas que segregan LIF en el medio de cultivo.

Se describe además en la presente memoria una célula aislada de un ratón como se ha definido antes. Preferiblemente, dicha célula tiene el genotipo $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$.

Se injertan en ratones de la invención células madre hematopoyéticas (HSC) humanas. Dichas HSC se pueden obtener, por ejemplo, de hígado fetal, sangre del cordón umbilical o médula ósea de adulto y se caracterizan por la expresión de CD34. Las células se pueden cultivar durante un tiempo adecuado antes de trasplante, para mejorar la tasa de injerto de los progenitores hematopoyéticos en el ratón. El número de células que se trasplantan se determina de modo que se obtenga un injerto óptimo en el ratón. Por ejemplo, se trasplantan células $CD34^+$ humanas (de 10^4 a 10^6 células) aisladas de sangre de cordón umbilical o hígado fetal por vía intraperitoneal, intrahepática o intravenosa, por ejemplo por una vena facial, en ratones transgénicos recién nacidos irradiados de forma subletal. El injerto de células en ratones inmunodeficientes se puede lograr usando métodos bien conocidos para los expertos en la técnica (Traggiai et al., *Science*, 2004,304, 104-107; Ishikawa et al., *Blood*, 2005, 106, 1565-1573; Gimeno et al., *Blood*, 2004, 104, 3886-3893; Vodyanik et al., *Blood*, 2005, 105, 617-626).

Además, las células progenitoras hematopoyéticas se pueden modificar genéticamente antes del trasplante. Pueden comprender ventajosamente una modificación genética que mejore la diferenciación de precursores hematopoyéticos en células T, B y dendríticas funcionales. Estas modificaciones son bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la expresión condicional de STAT5 en las células precursoras hematopoyéticas se puede obtener como se describe en Kyba y Daley (*Experimental Hematology*, 2003, 31, 994-1006).

Se describe en la presente memoria un método para comprometer el desarrollo de DC de ratón y de ese modo aumentar selectivamente el desarrollo de DC humanas en los ratones con HIS de la invención. El desarrollo de DC de ratón está comprometido en ratones receptores Balb/c $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}Flk2^{-/-}$ como resultado de la incapacidad para responder a Flk2L. El método se basa en la observación de que el tratamiento de ratones Balb/c $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}Flk2^{-/-}$ con xenoinjerto con Flk2L recombinante (también denominado ligando de Flt3) in vivo mejoró significativamente la frecuencia y el número absoluto de DC humanas maduras (tanto plasmocitoides como convencionales) sin ningún efecto sobre las DC endógenas de ratón. Además, los granulocitos humanos, monocitos, así como las células NK y células T humanas, aumentaron en ratones con HIS que recibieron Flk2L. Por consiguiente, en el método descrito antes, el número de DC en dichos ratones injertados se puede inducir mediante la administración de Flk2L. Se describe además en la presente memoria un método en donde el Flk2L murino se puede administrar a los ratones de la invención para aumentar el número de DC humanas. Se describe además en la presente memoria un método en donde el Flk2L se puede proporcionar a través de implante subcutáneo de células que expresan de forma natural

Flk2L o células que se han transfectado con un ADNc que codifica Flk2L. Dichas células incluyen, por ejemplo, la línea celular de melanoma B16 que expresa Flk2L. Además, se puede administrar la proteína Flk2L recombinante, que incluye, pero no se limita a una proteína de fusión Flk2L humano-Ig (disponible en BioXCell) (p. ej., por vía intravenosa o intraperitoneal) para estimular la producción de DC humanas

5.2. Ensayos de cribado

Los ratones de la invención proporcionan un medio nuevo para vigilar las respuestas inmunitarias humanas, ensayar candidatos a vacunas, cribar potenciales inmunoadyuvantes y comprender los mecanismos de subversión que operan modificando directamente la función de las DC humanas y/o modificando indirectamente las células T o células NK humanas.

Los ratones que llevan componentes del sistema inmunitario humano (HIS) se consideran un modelo preclínico importante para avanzar en la comprensión de las respuestas inmunitarias humanas y representan un intermedio importante para ensayar candidatos a vacunas humanas y para desarrollar nuevos medicamentos. Las DC son un subconjunto heterogéneo de células hematopoyéticas que actúan como detectores críticos de patógenos, "estrés" e inflamación. Las DC son un componente integral del sistema inmunitario y controlan las respuestas inmunitarias en varios niveles. Específicamente, (i) las DC mantienen y amplifican componentes inmunitarios innatos que representan una defensa de primera línea contra la infección y el cáncer, y (ii) las DC inician y especifican respuestas inmunitarias adaptativas (tanto celulares como humorales) que eliminan patógenos extraños o tumores y proporcionan respuestas de memoria duraderas. Como se describe en la presente memoria, son detectables pequeñas cantidades de DC que se parecen a las DC humanas maduras en tejidos linfoides de ratones con HIS Balb/c $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ después de la transferencia de células madre hematopoyéticas humanas, pero su frecuencia es baja y su desarrollo es variable. Por el contrario, los receptores inmunodeficientes existentes usados para generar ratones con HIS tienen un compartimento de DC de ratón endógenas normales. Como resultado, las respuestas inmunitarias observadas en los modelos actuales de ratón con HIS están controladas principalmente por las DC de origen de ratón. Puesto que las DC humanas y de ratón responden de manera diferente durante las respuestas inmunitarias, un modelo de ratón con HIS con un compartimento de DC de ratón mínimo y un compartimento de DC humanas máximo imitaría más de cerca las respuestas inmunitarias humanas normales.

Por consiguiente, se describe además en la presente memoria un método para analizar el desarrollo y la función del sistema inmunitario de una especie xenogénica in vivo, por ejemplo, el sistema inmunitario humano in vivo.

El método descrito en la presente memoria comprende:

(i) injertar células progenitoras hematopoyéticas xenogénicas, por ejemplo, células progenitoras hematopoyéticas humanas, en un ratón $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$; y

(ii) ensayar la presencia de células T, B o dendríticas funcionales de la especie xenogénica, por ejemplo humana, en el ratón trasplantado.

Preferiblemente, el método descrito en la presente memoria para analizar el desarrollo y función del sistema inmunitario de una especie xenogénica in vivo, comprende además la administración de Flk2L al ratón transgénico.

La invención se refiere a un método para analizar el desarrollo del sistema inmunitario de la especie humana in vivo, que comprende ensayar la presencia de células T, B o dendríticas funcionales de la especie humana en un ratón $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$ al que se le han trasplantado células progenitoras hematopoyéticas humanas y se le ha administrado Flk2L humano exógeno. Preferiblemente, el Flk2L se proporciona por administración de Flk2L recombinante.

En una realización específica de la invención, las células injertadas son células que se han modificado genéticamente antes del injerto.

La presencia de células T, B y dendríticas (DC) humanas funcionales se ensaya mediante cualquier técnica conocida en la materia. Por ejemplo, varias semanas después de trasplante de las células progenitoras hematopoyéticas (de 4 semanas a aproximadamente 12 semanas), se pueden analizar la médula ósea, bazo, timo y la sangre periférica por citometría de flujo y/o inmunohistoquímica, basándose en la expresión de marcadores adecuados. El nivel de injerto se determina midiendo el número de células leucocitos humanos ($CD45^+$) y la proporción de células T ($CD45^+$, $CD3^+$), células B ($CD45^+$, $CD19^+$) y células dendríticas ($CD45^+$, $CD11^+$ y $CD45^+$, $CD11^-CD123^+$) en diferentes órganos linfoides.

La presencia de células T humanas funcionales se puede ensayar midiendo la capacidad proliferativa de las células T, por ejemplo contra un aloantígeno (reacción de linfocitos mixtos) o su capacidad para producir citoquinas (ELISPOT, citometría de flujo intracelular). La diversidad del repertorio de células T se puede ensayar por análisis de inmunoscopio.

La presencia de células B humanas funcionales se puede ensayar midiendo las inmunoglobulinas humanas totales en el suero de ratones, la hIgG y la IgM por ELISA o las células secretoras de inmunoglobulina, por ELISPOT.

La presencia de DC funcionales se puede ensayar in vivo o ex vivo midiendo su capacidad para inducir la proliferación de células T alogénicas ($CD11^-$) o su capacidad para producir IFN-α después de estimulación (células $CD11^+$).

Se describe además en la presente memoria un método para analizar la respuesta inmunitaria de una especie xenogénica contra un antígeno in vivo, por ejemplo la respuesta inmunitaria humana contra un antígeno in vivo. El método descrito en la presente memoria comprende:

(i) poner en contacto un ratón $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$ de la invención con un antígeno de interés, y

(ii) analizar la presencia de una respuesta inmunitaria.

En dichos ensayos, la respuesta inmunitaria observada en presencia de un antígeno se puede comparar con la respuesta inmunitaria observada en ausencia de un antígeno, o en presencia de un antígeno o preparación de antígeno diferente, para evaluar y/o comparar la actividad del antígeno ensayado.

El ensayo de la presencia de una respuesta inmunitaria incluye, pero no se limita a la detección de un aumento, disminución o cambios en las propiedades de la respuesta inmunitaria.

Preferiblemente, en el método descrito antes, el ratón es un ratón $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$ en el que se han injertado células progenitoras hematopoyéticas xenogénicas.

Preferiblemente, en el método descrito antes, las células progenitoras hematopoyéticas xenogénicas son células humanas. Preferiblemente, en el método descrito antes, las células injertadas son células que se han modificado genéticamente antes del injerto.

Preferiblemente, en el método descrito antes, el método para analizar la respuesta inmunitaria de una especie xenogénica contra un antígeno in vivo, comprende además la administración de Flk2L al ratón transgénico.

La invención se refiere a un método para analizar la respuesta inmunitaria de la especie humana contra un antígeno in vivo, que comprende:

(i) poner en contacto un ratón $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$ al que se han trasplantado células progenitoras hematopoyéticas con un antígeno de interés, y al que se le ha administrado Flk2L humano exógeno, y

(ii) ensayar la presencia de una respuesta inmunitaria.

Preferiblemente, en el método de la invención, las células injertadas son células que se han modificado genéticamente antes del injerto.

La presencia de una respuesta inmunitaria se puede detectar ensayando una respuesta humoral, una respuesta de células T auxiliares, una respuesta de células T citotóxicas, una respuesta de células citotóxicas mediada por células NK, producción de citoquinas y/o quimioquinas mediada por células NK, una respuesta citotóxica mediada por DC, una producción de citoquinas y/o quimioquinas mediada por DC, o una respuesta inflamatoria de linfocitos innata en el ratón.

El antígeno se inyecta preferiblemente después de un tiempo suficiente para permitir la reconstitución de un sistema inmunitario funcional. Alternativamente, el antígeno se puede inyectar antes de la reconstitución de un sistema inmunitario funcional para examinar el efecto del antígeno sobre el desarrollo inmunitario.

El antígeno puede ser natural, recombinante o sintético. El antígeno puede comprender una secuencia de polipéptido o una secuencia de polinucleótido, que puede comprender ARN, ADN o ambos. En una realización, el antígeno comprende al menos una secuencia de polinucleótido que codifica operativamente uno o más polipéptidos antigénicos. Usada en este contexto, la palabra "comprende" significa que al menos un polipéptido antigénico es proporcionado por el aparato de transcripción y/o traducción de una célula hospedante que actúa sobre un polinucleótido exógeno que codifica al menos un polipéptido antigénico. Los antígenos de la invención pueden ser cualquier molécula antigénica. Las moléculas antigénicas incluyen: proteínas, lipoproteínas y glicoproteínas, incluyendo proteínas virales, bacterianas, parasitarias, animales y fúngicas tales como albúminas, toxoide tetánico, toxoide diftérico, toxoide pertúsico, proteínas de la membrana externa bacteriana (incluyendo la proteína de la membrana externa meningocócica), proteína F del RSV, péptido derivado de la malaria, B-lactoglobulina B, aprotinina, ovoalbúmina, lisozima y antígenos asociados a tumores tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA), CA 15-3, CA 125, CA 19-9, antígeno prostático específico (PSA); carbohidratos, incluyendo polisacáridos sintéticos y naturales y otros polímeros tales como ficoll, dextrano, carboximetilcelulosa, agarosa, poliacrilamida y otras resinas acrílicas, poli(lactida-co-glicólido), poli(alcohol vinílico), poli(acetato de vinilo) parcialmente hidrolizado, polivinilpirrolidona, polisacáridos capsulares estreptocócicos del grupo B y neumocócicos (incluyendo el tipo III), mucoexopolisacárido de *Pseudomonas aeruginosa* y polisacáridos capsulares (que incluyen tipo I de Fisher) y polisacáridos de *Haemophilus influenzae* (incluyendo PRP); haptenos y otros restos que comprenden moléculas de bajo peso molecular, tales como TNP, sacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, péptidos, toxinas, fármacos, productos químicos y alérgenos; y haptenos y antígenos derivados de bacterias, hongos, virus, parásitos y priones. Las bacterias incluyen, por ejemplo:

C. diphtheriae, B. pertussis, C. *tetani, H. influenzae, S. pneumoniae, E. Coli,* Klebsiella, *S. aureus, S. epidermidis, N. meningiditis, B. anthracis,* Listeria, *Chlamydia trachomatis* y *pneumoniae,* Rickettsiae, estreptococos del grupo A, estreptococos del grupo B, *Pseudomonas aeruginosa,* Salmonella, Shigella, micobacterias *(Mycobacterium tuberculosis)* y micoplasma. Los virus incluyen por ejemplo: virus de la polio, paperas, sarampión, rubéola, rabia, ébola, hepatitis A, B, C, D y E, varicela zóster, herpes simple tipos 1 y 2, parainfluenzae, tipos 1, 2 y 3, virus de inmunodeficiencia humana I y II, RSV, CMV, EBV, rinovirus, virus de influenza A y B, adenovirus, coronavirus, rotavirus y enterovirus. Los hongos incluyen por ejemplo: *Candida sp. (Candida albicans).* Los parásitos incluyen por ejemplo: Plasmodium *(Plasmodium falciparum), Pneumocystis carinii,* Leishmania y Toxoplasma.

La presencia de una respuesta inmunitaria contra el antígeno se ensaya por cualquier técnica conocida en la materia. Por ejemplo, la presencia de una respuesta humoral contra el antígeno se analiza midiendo, ya sea el título de anticuerpos específicos del antígeno en sueros de ratones, por ELISA, o el número de células secretoras de anticuerpos, por ELISPOT. La presencia de una respuesta de células T auxiliares contra el antígeno se ensaya mediante un ensayo de proliferación de células T o ensayos de producción de citoquinas (ELISPOT o citometría de flujo intracelular). La presencia de una respuesta de células T citotóxicas contra el antígeno se analiza por un ensayo de CTL in vitro o in vivo (Barber DL et al., *J Immunol*, 2003, 171: 27-31).

El método de la invención también se puede usar para cartografiar antígenos, para cribar nuevos antígenos, así como para evaluar la inmunogenicidad de diferentes preparaciones de antígenos para usar como vacuna humana.

Se describe además en la presente memoria un método para analizar la capacidad de la respuesta inmunitaria de una especie xenogénica para ser modificada por un adyuvante in vivo, por ejemplo la modificación de la respuesta inmunitaria humana por un adyuvante in vivo. El método descrito en la presente memoria comprende las etapas de:

(i) poner en contacto un ratón $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$ con un antígeno de interés en presencia de un adyuvante que se va a ensayar; y

(ii) ensayar la presencia de una respuesta inmunitaria.

En dichos ensayos, la respuesta inmunitaria observada en presencia de un adyuvante se puede comparar con la respuesta inmunitaria observada en ausencia de un adyuvante, o en presencia de un adyuvante diferente, para examinar y/o comparar la actividad del adyuvante ensayado.

El ensayo de la presencia de una respuesta inmunitaria incluye, pero no se limita a la detección de un aumento, disminución o cambios en las propiedades de la respuesta inmunitaria.

Preferiblemente, en el método descrito antes, el ratón es un ratón $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$ en el que se han injertado células progenitoras hematopoyéticas xenogénicas.

Preferiblemente, en el método descrito antes, las células progenitoras hematopoyéticas xenogénicas son células humanas. Preferiblemente, las células injertadas son células que han sido modificadas genéticamente antes del injerto.

Preferiblemente, el método para analizar la capacidad de la respuesta inmunitaria de una especie xenogénica para ser modificada por un adyuvante in vivo comprende además la administración de Flk2L al ratón.

La invención se refiere además a un método para analizar la capacidad de la respuesta inmunitaria de la especie humana para ser modificada por un adyuvante in vivo, que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto un ratón $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$ al que se le han trasplantado células progenitoras hematopoyéticas humanas y se le ha administrado Flk2L humano exógeno, con un antígeno de interés en presencia de un adyuvante que se va a ensayar; y

(ii) ensayar la presencia de una respuesta inmunitaria.

Preferiblemente, las células injertadas son células que se han modificado genéticamente antes del injerto.

La presencia de una respuesta inmunitaria se puede detectar ensayando una respuesta humoral, una respuesta de células T auxiliares, una respuesta de células T citotóxicas, una respuesta de células citotóxicas mediada por células NK, producción de citoquinas y/o quimioquinas mediada por células NK, una respuesta citotóxica mediada por DC, una producción de citoquinas y/o quimioquinas mediada por DC, o una respuesta inflamatoria de linfocitos innata en el ratón.

El antígeno en presencia de un adyuvante a ensayar se inyecta preferiblemente después de un tiempo suficiente para permitir la reconstitución de un sistema inmunitario funcional. El adyuvante se puede inyectar antes, combinado con o después del antígeno. Alternativamente, el efecto del adyuvante sobre el desarrollo inmunitario se puede examinar por inyección antes de la reconstitución de un sistema inmunitario funcional.

El adyuvante puede ser natural, recombinante o sintético. El adyuvante puede comprender una secuencia de polipéptido o una secuencia de polinucleótido, que puede comprender ARN, ADN o ambos. En una realización, el

adyuvante comprende al menos una secuencia de polinucleótido que codifica operativamente uno o más adyuvantes. Usado en este contexto, la palabra "comprende" significa que al menos un adyuvante es proporcionado por el aparato de transcripción y/o traducción de una célula hospedante que actúa sobre un polinucleótido exógeno que codifica al menos un adyuvante. Los adyuvantes de la invención pueden ser cualquier molécula con actividad adyuvante. Los adyuvantes incluyen proteínas, lipoproteínas y glicoproteínas, incluyendo proteínas víricas, bacterianas, parasitarias, animales y fúngicas tales como toxoides, proteínas de la membrana externa bacteriana (incluyendo la proteína de la membrana externa meningocócica), carbohidratos, incluyendo polisacáridos sintéticos y naturales y otros polímeros tales como ficoll, dextrano, carboximetilcelulosa, agarosa, poliacrilamida y otras resinas acrílicas, poli(lactida-co-glicólido), poli(alcohol vinílico), poli(acetato de vinilo) parcialmente hidrolizado, polivinilpirrolidona, polisacáridos capsulares estreptocócicos del grupo B y neumocócicos (incluyendo el tipo III), mucoexopolisacárido de *Pseudomonas aeruginosa* y polisacáridos capsulares (incluyendo tipo I de Fisher) y polisacáridos de *Haemophilus influenzae* (incluyendo PRP); haptenos y otros restos que comprenden moléculas de bajo peso molecular, tales como sacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, péptidos, toxinas, fármacos, productos químicos y alérgenos; y haptenos y antígenos derivados de bacterias, hongos, virus, parásitos y priones. Las bacterias que contienen compuestos adyuvantes incluyen, por ejemplo: *C. diphtheriae, B. pertussis*, C. *tetani, H. influenzae, S. pneumoniae, E. Coli,* Klebsiella, *S. aureus, S. epidermidis, N. meningiditis, B. anthracis,* Listeria, *Chlamydia trachomatis* y *pneumoniae,* Rickettsiae, estreptococos del grupo A, estreptococos del grupo B, *Pseudomonas aeruginosa,* Salmonella, Shigella, micobacterias *(Mycobacterium tuberculosis)* y micoplasma. Los virus que proporcionan potencial actividad adyuvante incluyen por ejemplo: virus de la polio, paperas, sarampión, rubéola, rabia, ébola, hepatitis A, B, C, D y E, varicela zóster, herpes simple tipos 1 y 2, parainfluenzae, tipos 1, 2 y 3, virus de inmunodeficiencia humana I y II, RSV, CMV, EBV, rinovirus, virus de la gripe A y B, adenovirus, coronavirus, rotavirus y enterovirus. Los hongos incluyen por ejemplo: *Candida sp. (Candida albicans).* Los parásitos incluyen por ejemplo: Plasmodium *(Plasmodium falciparum), Pneumocystis carinii,* Leishmania y Toxoplasma.

La presencia de una respuesta inmunitaria modificada contra el antígeno en presencia de un adyuvante se ensaya por cualquier técnica conocida en la materia.

La presencia de una respuesta humoral contra el antígeno se ensaya midiendo, ya sea el título de anticuerpos específicos del antígeno en sueros de ratones, por ELISA, o el número de células secretoras de anticuerpos, por ELISPOT.

La presencia de una respuesta de células T auxiliares contra el antígeno se ensaya por un ensayo de proliferación de células T o ensayos de producción de citoquinas (ELISPOT o citometría de flujo intracelular).

La presencia de una respuesta de células T citotóxicas contra el antígeno se ensaya por un ensayo de CTL in vitro o in vivo (Barber DL et al., *J Immunol*, 2003, 171: 27-31).

El método de la invención se puede usar para clasificar adyuvantes, para el cribado de nuevos adyuvantes, así como para evaluar los potenciales efectos de adyuvantes en candidatos a vacunas humanas.

Se describen además en la presente memoria composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un antígeno identificado usando los métodos de cribado de la invención, que es capaz de estimular eficazmente una respuesta inmunitaria, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se describen además en la presente memoria composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un adyuvante identificado usando los métodos de cribado de la invención que es capaz de estimular eficazmente una respuesta inmunitaria y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o citado en la Farmacopea de EE.UU. u otras farmacopeas reconocidas generalmente para uso en animales, y más en particular en seres humanos. El término "vehículo" 'se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical sciences" de E W. Martin.

Preferiblemente, los animales transgénicos de la invención y los descritos en la presente memoria proporcionan un sistema modelo para cribar, o identificar, compuestos que modulan (inhiben o activan) el desarrollo, homeostasis, maduración o función de las DC humanas. Por consiguiente, se describen en la presente memoria métodos para identificar un compuesto que induce el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC, que comprende (i) poner en contacto un ratón transgénico $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$ de la invención con un compuesto de ensayo y (ii) medir el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC; en donde un aumento en el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC, en presencia del compuesto de ensayo, indica que el compuesto de ensayo induce el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC.

Se describen además en la presente memoria métodos para identificar un compuesto que inhibe el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC, que comprenden (i) poner en contacto un ratón $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$ de la invención con un compuesto de ensayo y medir el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC; (ii) en un experimento separado, medir el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC, en ausencia del compuesto de ensayo, donde las condiciones son esencialmente las mismas que en la parte (i), y después (iii) comparar el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC medido en la parte (i) con el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC en la parte (ii), en donde un nivel menor de desarrollo,

homeostasis, maduración o función de DC en (i) comparado con (ii) indica que el compuesto de ensayo es un inhibidor del desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC.

Preferiblemente, el ratón descrito en la presente memoria, para usar en el cribado o identificación de compuestos que modulan (inhiben o activan) el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC humanas, es un ratón $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$ en el que se han injertado células progenitoras hematopoyéticas xenogénicas.

Preferiblemente, las células progenitoras hematopoyéticas xenogénicas son células humanas. Preferiblemente, las células injertadas son células que se han modificado genéticamente antes del injerto.

Preferiblemente, los métodos descritos en la presente memoria para usar en el cribado o identificación de compuestos que modulan (inhiben o activan) el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC humanas, comprenden además la administración de Flk2L al ratón.

El sistema murino de la invención y los descritos en la presente memoria, que lleva componentes del sistema inmunitario humano que incluyen la expresión de DC humanas, proporciona además un medio para ensayar la eficacia, toxicidad o efectos secundarios de terapias desarrolladas recientemente, incluyendo inmunoterapias. También se pueden ensayar tratamientos contra el cáncer recientemente desarrollados para determinar su eficacia, toxicidad y/o presencia de efectos secundarios.

Los tratamientos de enfermedades infecciosas se pueden ensayar usando los ratones de la invención y los descritos en la presente memoria. Dichas enfermedades infecciosas incluyen, por ejemplo, enfermedades bacterianas, virales, fúngicas o parasitarias. Además, los tratamientos diseñados para inhibir el rechazo de trasplantes se pueden ensayar usando los ratones de la invención.

Los ratones de la invención y los descritos en la presente memoria también proporcionan un sistema de modelo animal para el cribado de compuestos que modulan la actividad o el nivel de expresión de Flk2L y/o Flk2, regulando así el desarrollo, homeostasis, maduración o función de las DC. Dichos compuestos se pueden usar en inmunoterapias para el tratamiento de enfermedades patógenas, cáncer, enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias y para el tratamiento de pacientes trasplantados.

Se describen además en la presente memoria métodos para identificar un compuesto que aumenta la expresión o actividad de Flk2L, es decir, un agonista, induciendo así el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC, que comprenden (i) poner en contacto un ratón $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$ de la invención con un compuesto de ensayo y (ii) medir el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC; en donde un aumento en el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC en presencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo aumenta la expresión o actividad de Flk2L.

La invención se relaciona con métodos para identificar un compuesto que aumenta la actividad de Flk2L, induciendo así el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC, que comprenden:

(i) poner en contacto un ratón $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$ al que se han injertado células progenitoras hematopoyéticas humanas y se le ha administrado Flk2L humano exógeno, con un compuesto de ensayo; y

(ii) medir el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC en presencia del compuesto de ensayo, en donde un aumento en el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC indica que el compuesto de ensayo aumenta la actividad de Flk2L.

Se describen además en la presente memoria métodos para identificar un compuesto que inhibe la actividad o expresión de Flk2 o Flk2L, es decir, un antagonista, inhibiendo así el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC, que comprende (i) poner en contacto un ratón $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$ de la invención con un compuesto de ensayo, en presencia de Flk2L y medir el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC; (ii) en un experimento separado, medir el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC, en un ratón de la invención en ausencia del compuesto de ensayo, donde las condiciones son esencialmente las mismas que en la parte (i), y después (iii) comparar el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC medido en la parte (i) con el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC en la parte (ii), en donde un nivel menor del desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC en (i) comparado con (ii) indica que el compuesto de ensayo es un inhibidor de Flk2 o Flk2L.

La invención se relaciona además con métodos para identificar un compuesto que inhibe la actividad o expresión de Flk2 o Flk2L, inhibiendo así el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC, que comprende:

(i) poner en contacto un ratón $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$ al que se le han injertado células progenitoras hematopoyéticas humanas y se le ha administrado Flk2L, con un compuesto de ensayo y medir el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC;

(ii) en un experimento separado, medir el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC, en un ratón de la invención en ausencia del compuesto de ensayo, donde las condiciones son esencialmente las mismas que en

la parte (i) y después;

comparar el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC medido en la parte (i) con el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC en la parte (ii), en donde un nivel menor del desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC en (i) comparado con (ii) indica que el compuesto de ensayo es un inhibidor de Flk2 o Flk2L.

Preferiblemente, las células injertadas son células que se han modificado genéticamente antes del injerto.

Preferiblemente, el ratón descrito en la presente memoria, para usar en el cribado de compuestos que modulan la actividad o el nivel de expresión de Flk2L y/o Flk2, regulando así el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC, es un ratón $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$ en el que se han injertado células progenitoras hematopoyéticas xenogénicas.

Preferiblemente, las células hematopoyéticas xenogénicas son células humanas. Preferiblemente, las células injertadas son células que se han modificado genéticamente antes del injerto.

La capacidad de una molécula de ensayo para modular el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC se puede medir usando técnicas bioquímicas y fisiológicas convencionales. Preferiblemente, el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC se pueden medir mediante la detección de marcadores de superficie celular específicos que se expresan en la superficie de DC a medida que maduran y se diferencian. Por ejemplo, a medida que las DC se diferencian, aumenta el nivel de expresión de CD80, CD86 y MHC de clase I y II en la superficie celular. La diferenciación de DC también se puede medir mediante funciones efectoras de las DC, incluyendo la producción de quimioquinas y citoquinas.

Los métodos preferidos para la identificación de dichos marcadores de superficie celular en la muestra biológica de un animal de ensayo pueden implicar, por ejemplo, inmunoensayos en donde los marcadores de superficie celular se detectan por su interacción con un anticuerpo específico de la superficie celular. Dichos anticuerpos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos anti-CD80, anti-CD86 y anti-MHC de clase I y clase II, por nombrar algunos. Los anticuerpos útiles en la presente invención se pueden usar para detectar cuantitativa o cualitativamente la presencia de marcadores de superficie de las DC. Además, se pueden usar reactivos distintos de anticuerpos, tales como, por ejemplo, polipéptidos que se unen específicamente a proteínas marcadoras de superficie celular, en ensayos para detectar el nivel de expresión de proteínas. Los inmunoensayos útiles en la práctica de la invención incluyen, pero no se limitan a sistemas de ensayo que usan técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, por nombrar solo algunos.

Una muestra de un fluido biológico o tejido biológico para examinar los niveles de células dendríticas, tales como sangre u otro tejido biológico, se obtiene del animal de ensayo. Los inmunoensayos para detectar DC comprenden típicamente poner en contacto la muestra biológica, tal como una muestra de sangre o tejido derivada del animal de ensayo, con un anticuerpo anti-marcador de superficie celular en condiciones tales que se pueda producir una reacción inmunoespecífica de unión antígeno-anticuerpo, y detectar o medir la cantidad de cualquier unión inmunoespecífica por el anticuerpo. En un aspecto específico, dicha unión del anticuerpo se puede usar, por ejemplo, para detectar la presencia de una o más proteínas marcadores de superficie celular expresadas específicamente en DC diferenciadas en donde la detección de dichas proteínas es una indicación de diferenciación de DC.

La detección de anticuerpos unidos a marcadores específicos de superficie de DC se puede lograr usando una variedad de métodos. Por ejemplo, por marcaje radiactivo de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, se puede detectar la expresión de la proteína citidina desaminasa mediante el uso de un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo de 1986). El isótopo radiactivo se puede detectar por medios tales como el uso de un contador gamma o un contador de centelleo o por autorradiografía. El anticuerpo también se puede marcar con un compuesto fluorescente. Entre los compuestos marcadores fluorescentes usados más habitualmente se encuentran el isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y fluorescamina. Asimismo, se puede usar un compuesto bioluminiscente para marcar el anticuerpo. La presencia de una proteína de bioluminiscencia se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes importantes para fines de marcaje son la luciferina, luciferasa y aequorina.

Los ensayos descritos antes pueden identificar compuestos que modulan la maduración o actividad de las DC. Por ejemplo, los compuestos que afectan a la actividad de Flk2 o Flk2L incluyen, pero no se limitan a compuestos que se unen a Flk2 o Flk2L y activan la actividad de ligando/receptor (agonistas) o bloquean la actividad de ligando/receptor (antagonistas). Alternativamente, se pueden identificar compuestos (agonistas o antagonistas) que no se unen directamente a Flk2 o Flk2L pero que son capaces de alterar su actividad alterando la actividad de una proteína implicada en la ruta de transducción de señales mediada por Flk2.

Los compuestos que se pueden seleccionar de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a pequeños

compuestos orgánicos o inorgánicos, péptidos, anticuerpos y fragmentos de los mismos, y otros compuestos orgánicos, p. ej., peptidomiméticos). Los compuestos pueden incluir, pero no se limitan a péptidos tales como, por ejemplo, péptidos solubles, que incluyen pero no se limitan a miembros de bibliotecas de péptidos aleatorias (véase, p. ej., Lam, K.S. et al., 1991, *Nature* 354:82-84; Boughten, R. et al., 1991, *Nature* 354:84-86); y biblioteca molecular derivada de química combinatoria hecha de aminoácidos de configuración D- y/o L, fosfopéptidos (incluyendo, pero no limitado a miembros de bibliotecas de fosfopéptidos dirigidas, aleatorias o parcialmente degeneradas; (véase, p. ej., Songyang, Z. et al., 1993, *Cell* 72:767-778), anticuerpos (que incluyen, pero no se limitan a anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, antiidiotípicos, quiméricos o monocatenarios, y Fab, F(ab')2 y fragmentos de bibliotecas expresión de Fab y fragmentos de unión a epítopo de los mismos) y pequeñas moléculas orgánicas o inorgánicas.

Se describen además en la presente memoria composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un compuesto identificado usando los métodos de cribado de la invención que es capaz de modular (aumentar o disminuir) el número de DC maduras y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o mencionado en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más en particular en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical sciences" de E. W. Martin.

Se describen además en la presente memoria métodos y composiciones para prevenir la aparición o avance de enfermedades infecciosas, que incluyen, pero no se limitan a las que surgen de infecciones con patógenos tales como virus, bacterias, hongos o parásitos. El método comprende administrar a un mamífero un compuesto que induce el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC en una cantidad eficaz para prevenir la aparición de la enfermedad infecciosa o para ralentizar o detener la progresión de dicha enfermedad. Los compuestos se pueden administrar como un producto terapéutico para tratar una afección existente o como un producto profiláctico antes de la exposición al patógeno.

Se describen además en la presente memoria métodos y composiciones para prevenir la aparición o avance de un cáncer o afección precancerosa. El método comprende administrar a un mamífero un compuesto que induce el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC en una cantidad eficaz para prevenir la aparición del cáncer, o para ralentizar o detener la progresión de dicha enfermedad. Los compuestos se pueden administrar como un producto terapéutico para tratar una afección existente o como un producto profiláctico antes de la exposición a un compuesto o suceso carcinogénico.

Se describen además en la presente memoria métodos y composiciones para prevenir el rechazo de trasplantes en pacientes trasplantados. El método comprende administrar a un mamífero un compuesto que induce el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC en una cantidad eficaz para prevenir el rechazo del trasplante.

Se describen además en la presente memoria métodos y composiciones para prevenir la aparición o avance de un trastorno autoinmunitario. El método comprende administrar a un mamífero un compuesto que inhibe el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC en una cantidad eficaz para prevenir la aparición del trastorno autoinmunitario, o para ralentizar o detener el avance de dicha enfermedad.

Se describen además en la presente memoria métodos y composiciones para prevenir la aparición o avance de un trastorno inflamatorio. El método comprende administrar a un mamífero un compuesto que inhibe la maduración de las DC en una cantidad eficaz para prevenir la aparición del trastorno autoinmunitario, o para ralentizar o detener el avance de dicha enfermedad. Dichas afecciones antiinflamatorias incluyen, pero no se limitan a artritis, asma y alergias.

Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar un compuesto capaz de modular el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor (véase, p. ej., Wu y Wu, 1987, *J. Biol Chem*. 262:4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección de bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. También se puede emplear la administración pulmonar, p. ej., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosol.

Preferiblemente, puede ser deseable administrar las composiciones descritas en la presente memoria localmente en una zona específica del cuerpo; esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante cirugía, aplicación tópica, p. ej., junto con un apósito para heridas después de cirugía, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras.

La cantidad del compuesto descrito en la presente memoria que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección y se puede determinar por técnicas clínicas convencionales. Además, se pueden usar opcionalmente ensayos in vitro para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimos. La dosis precisa que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas se pueden extrapolar de las curvas de respuesta a la dosis derivadas de sistemas de ensayo de modelos animales o in vitro. Adicionalmente, la administración del compuesto se podría combinar con otros fármacos eficaces conocidos si los estudios in vitro e in vivo indican un efecto terapéutico sinérgico o aditivo cuando se administran en combinación.

Se describe además en la presente memoria un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas descritas antes, opcionalmente asociado con dicho(s) envase(s) puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para administración humana.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. Ausebel, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, EE.UU.); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); DNA Cloning, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. patente de EE.UU. nº 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries y S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); las series, Methods In Enzymology (J. Abelson y M. Simon, eds.-in-chief, Academic Press, Inc., New York), específicamente, los Vols.154 y 155 (Wu et al. eds.) y Vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); y Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

6. Ejemplo 1

6.1. Materiales y métodos

Generación de cepas de ratones receptores y ratones con HIS

Se retrocruzaron ratones Rag2$^{-/-}$γc$^{-/-}$ (Colucci et al., 1999, *Journal of Immunology* 162: 2761-2765) y ratones Flk2$^{-/-}$ (Mackarehtschian et al., 1995, *Immunity* 3: 147-61) en el contexto de Balb/c y se entrecruzaron para generar receptores Rag2$^{-/-}$γc$^{-/-}$Flk2$^{-/-}$. Todos los ratones se mantuvieron en aisladores con comida y agua tratadas en autoclave. Los ratones con un sistema inmunitario humano (HIS) se generaron como se ha descrito previamente (Gimeno et al., 2004, *Blood* 104: 3886-3893; Huntington et al., 2009, *Journal of Experimental Medicine* 206: 25-34). Brevemente, los ratones receptores recién nacidos (3-5 días de edad) recibieron irradiación corporal total subletal (3,3 Gy) de una fuente de Cs y se les inyectó por vía intrahepática (i.h.) 1x10^5 células progenitoras hematopoyéticas humanas CD34$^+$CD38$^-$ separadas o 5x10^5 CD34$^+$. Todas las manipulaciones de ratones con HIS se realizaron bajo flujo laminar.

Preparación celular

El material fetal humano se obtuvo de abortos electivos, con una edad gestacional de 14 a 20 semanas. El uso de este tejido fue aprobado por los Comités de Ética Médica y estaba sujeto al consentimiento informado. Las suspensiones unicelulares de órganos fetales humanos se lograron mediante rotura mecánica usando un sistema de laboratorio Stomacher® Biomaster (Seward, Hadleigh, Reino Unido). El enriquecimiento magnético de células CD34$^+$ (> 98% de pureza) se realizó usando el kit de aislamiento de células progenitoras CD34 (Miltenyi Biotech. Auburn, CA), después de la preparación de una suspensión unicelular y aislamiento de células mononucleares por centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoil-Hypaque (Nycomed Pharma, Roskilde, Dinamarca). Las suspensiones celulares se prepararon en medio RPMI con suero de ternero fetal al 2%. Las suspensiones unicelulares se prepararon como se ha descrito previamente (Huntington et al., 2009, *Journal of Experimental Medicine* 206: 25-34).

Tratamiento con Flk2L in vivo

Se inyectó en ratones con HIS por vía intraperitoneal Flk2L humano recombinante (5 µg; Amgen; 3 veces por semana durante 2 semanas), Flk2L humano-Ig (10 µg: BioXcell; 3 veces por semana durante 2 semanas) o líneas de células de melanoma B16 de ratón (10^6 células, s.c.) comenzando a las 8 semanas después de la reconstitución con células progenitoras hematopoyéticas humanas CD34$^+$.

Análisis fenotípico

Las suspensiones celulares se marcaron con mAb contra los siguientes marcadores de superficie celular humana: CD3 (SK7), CD4 (SK3), CD34 (581), CD8 (SK1), CD19 (HIB19), CD10 (HI10a), CD38 (HB7), NKG2D (1D11), NKp46 (9E2), CD16 (3G8), CD161 (DX12), CD56 (B159), HLA-DR (L243), HLA-A/B/C (G46-2.6), CD117 (YB5.B8), IgD (IA6-2), IgM (G20-127), CD14 (M5E2), CD122 (Mik-β3), TCR-α/β (T10B9.1A31), CD127 (hIL-7R-M21), CD11c (B-1y6), CD7 (M-T701), CD107a (1D4B), CD45 (2D1), CD69 (L78), Bcl-2 (Bcl-2/100), IFN-μ (XMG1.2) de BD Bioscience (San Jose, CA) y CD11b (ICRF44), CD25 (BC96), CD116 (4H1), CD83 (HB15e), anti-NK1.1 de ratón, CD11b, CD11c, F480 y DX5 de eBioscience (San Diego, CA). Todos los lavados y diluciones de reactivos se hicieron con PBS que contenía suero de ternero fetal al 2% (FCS). Todas las adquisiciones se realizaron usando citómetros LSRII, Canto 1 o Canto 2, las separaciones celulares se realizaron usando FACS ARIA; todas las máquinas se conectaron con el software FACS-Diva (BD Bioscience).

Análisis de citoquinas humanas in vitro

Se cultivaron esplenocitos a $2{,}5x10^5$ células/ml en RPMI complementado con FCS al 10% durante 24 horas en presencia de los ligandos de TLR indicados (concentración final 5-20 ug/ml). Los factores solubles de origen humano secretados en el líquido sobrenadante del cultivo se detectaron y se cuantificaron usando tecnología de Luminex.

6.2 Resultados

Los ratones deficientes en Flk2 se describieron inicialmente en un contexto de C57BL/6 (Mackarehtschian et al., 1995, *Immunity* 3: 147-61). Se estableció un ensayo de cribado basado en PCR para detectar los alelos WT y KO de Flk2. Una vez establecido, se realizó el retrocruzamiento del alelo mutante de Flk2 en el contexto de Balb/c. Se realizaron más de 7 generaciones de retrocruzamientos. Los ratones mutantes de Flk2 después se cruzaron con ratones Balb/c $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ para generar ratones mutantes $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}Flk2^{-/-}$ en el contexto de Balb/c (Figura 1).

Se ensayó la cepa $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}Flk2^{-/-}$ para determinar si tenía las características deseadas inyectando en estos ratones (y ratones $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ como controles) células de melanoma B16 que secretan constitutivamente el ligando Flk2 de ratón. Se analizaron los efectos sobre el compartimento de células dendríticas de ratones portadores de tumores. Los ratones con un receptor Flk2 funcional tenían las DC expandidas en gran medida en el bazo y la médula ósea. Los ratones $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}Flk2^{-/-}$ no tenían cambios en sus compartimentos de DC en comparación con los ratones a los que no se inyectó tumor. Estos resultados (Figura 2) demuestran que las DC de ratón residuales en ratones $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}Flk2^{-/-}$ no pueden responder al ligando de Flk2 exógeno.

Se usó el procedimiento descrito previamente por Huntington et al., (2009, *Journal of Experimental Medicine* 206: 25-34) para reconstituir el sistema inmunitario humano en ratones $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}Flk2^{-/-}$. El desarrollo de las células B y T humanas fue similar al descrito previamente. A los ratones con HIS hechos en la cepa $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}Flk2^{-/-}$ se les inyectó Flk2L (5 μg/ratón; 3 veces por semana durante 2 semanas) y se analizaron a las 8 semanas de edad. Estos ratones se denominan ratones con HIS reforzados con DC. Se observó una fuerte expansión del compartimento de DC humano en ratones con HIS reforzados con DC (Figura 3). Los esplenocitos de ratones con HIS reforzados con DC se aislaron y estimularon in vitro usando un panel de ligandos que activan las DC humanas y/o de ratón. Después se analizó en los factores solubles secretados por estas células cultivadas el interferón-α humano y la IL-12 humana. Solo los ratones con HIS reforzados con DC albergaban DC humanas con la capacidad de producir adecuadamente interferón-α humano e IL-12 humana después de la estimulación con ligandos de TLR (Figura 4). En ratones con HIS reforzados con DC, también mejoró el desarrollo de células NK humanas (Figura 5), lo que sugiere que una mayor disponibilidad de citoquinas derivadas de DC humanas (por ejemplo, IL-15) también podría tener impacto en la homeostasis de células NK humanas en este modelo de ratón con HIS.

REIVINDICACIONES

1. Un ratón $Rag^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$ deficiente para el gen activador de recombinación 2 (Rag2) y/o el gen activador de recombinación 1 (Rag1), cadena gamma del receptor de interleuquina-2 (γ_c) y quinasa de hígado fetal 2 (Flk2) que comprende una alteración en el(los) gen(es) Rag1 y/o Rag2, en el gen γc y el gen Flk2,

(i) con células progenitoras hematopoyéticas humanas injertadas, y

(ii) al que se administra ligando de la quinasa de hígado fetal 2 humano exógeno (Flk2L).

2. El ratón de la reivindicación 1, en donde el Flk2L se ha proporcionado por administración de Flk2L recombinante.

3. El ratón de la reivindicación 1 o 2, que tiene el genotipo $Rag2^{-/-}$, $\gamma_c^{-/-}$, $Flk2^{-/-}$.

4. El ratón de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además tiene un contexto de Balb/c.

5. Un método par analizar el desarrollo del sistema inmunitario de la especie humana in vivo, que comprende ensayar la presencia de células T, B o dendríticas funcionales de la especie humana, en un ratón según la reivindicación 1.

6. El método de la reivindicación 5, en donde el Flk2L se ha proporcionado por administración de Flk2L recombinante.

7. Un método para analizar la respuesta inmunitaria de la especie humana contra un antígeno in vivo que comprende:

(i) poner en contacto un ratón según la reivindicación 1 con un antígeno de interés, y,

(ii) ensayar la presencia de una respuesta inmunitaria.

8. Un método para analizar la capacidad de la respuesta inmunitaria de la especie humana para ser modificada mediante un adyuvante in vivo, que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto un ratón según la reivindicación 1 con un antígeno de interés, en presencia de un adyuvante que se va a ensayar; y

(ii) ensayar la presencia de una respuesta inmunitaria.

9. Un método para analizar la capacidad de patógenos para modificar las respuestas inmunitarias de la especie humana in vivo, caracterizado por que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto un ratón según la reivindicación 1 con un patógeno; y,

(ii) ensayar la presencia de una respuesta inmunitaria.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7, 8 o 9, en donde el Flk2L humano exógeno se ha administrado por administración de Flk2L recombinante.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde la presencia de una respuesta inmunitaria se detecta por análisis de una respuesta humoral, una respuesta de células T auxiliares, una respuesta de células T citotóxicas, una respuesta de células citotóxicas mediada por células citolíticas naturales (NK), producción de citoquinas y/o quimioquinas mediada por células NK, respuesta citotóxica mediada por células dendríticas (DC), una producción de citoquinas y/o quimioquinas mediada por DC, o una respuesta inflamatoria linfocítica innata en el ratón.

12. Un método para identificar un compuesto que aumenta la actividad de Flk2L, induciendo así el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC, que comprende:

(i) poner en contacto un ratón según la reivindicación 1 con un compuesto de ensayo; y

(ii) medir el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC; en presencia del compuesto de ensayo en donde un aumento en el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC indica que el compuesto de ensayo aumenta la actividad de Flk2L.

13. Un método para identificar un compuesto que inhibe la actividad o expresión de Flk2 o Flk2L, inhibiendo así el desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC, que comprende:

(i) poner en contacto un ratón según la reivindicación 1 con un compuesto de ensayo; y medir el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC;

(ii) en un experimento separado, medir el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC en un ratón según la reivindicación 1 en ausencia del compuesto de ensayo, donde las condiciones son esencialmente las mismas que en la parte (i) y después,

comparar el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC en la parte (i) con el nivel de desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC en la parte (ii), en donde un nivel menor del desarrollo, homeostasis, maduración o función de DC en (i) comparado con (ii) indica que el compuesto de ensayo es un inhibidor de Flk2 o Flk2L.

14. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, en donde dicho ratón además tiene un contexto de Balb/c.

Concepto detrás de ratones $Rag^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ deficientes en Flk2

Flk2 (Flt3) un receptor tirosina quinasa con homología con c-Kit (el receptor para el factor de células madre y c-fms (el receptor para M-CSF). Flk2 es altamente expresado en células progenitoras hematopoyéticas.

Ratones $Flk2^{-/-}$	- Recuentos de sangre periférica normales
	- El número de células pro-B disminuye
	- Los progenitores de la médula ósea presentan una menor capacidad para reconstituir competitivamente receptores letalmente condicionados, más pronunciada en el linaje T y mieloide
	- Sin cambios significativos en los glóbulos rojos y plaquetas
	- Disminución del número de células nucleadas completas en la sangre periférica, médula ósea, bazo, ganglios linfáticos, lo más notable en número de linfocitos relativo
	- Disminuye el número total de CFU-GM y precursores de células B.
	- Número cinco veces menor de células NK
	- Número 4-14 veces menor de células dendríticas en órganos linfoides
	- El ligando de Flk2 humano y de ratón tienen alta homología y tienen reactividad cruzada
Ratones + Flk2L	- La inyección de ligando de Flk2 humano in vivo aumentaba el número de linfocitos Médula ósea: granulocitos, monocitos Órganos linfoides: células NK (12), DC 4-27 veces
	El ligando de Flk2 puede dirigir el desarrollo de DC junto con las rutas de desarrollo linfoide y mieloide de progenitores de Flk2/Flt3+

Figura 1a

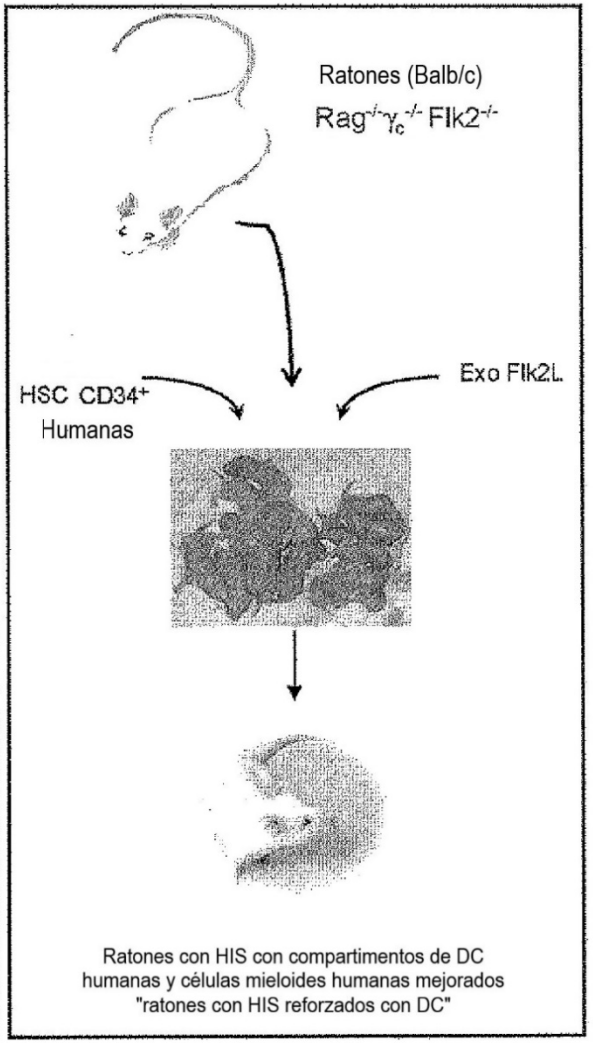

Figura 1b

ES 2 817 792 T3

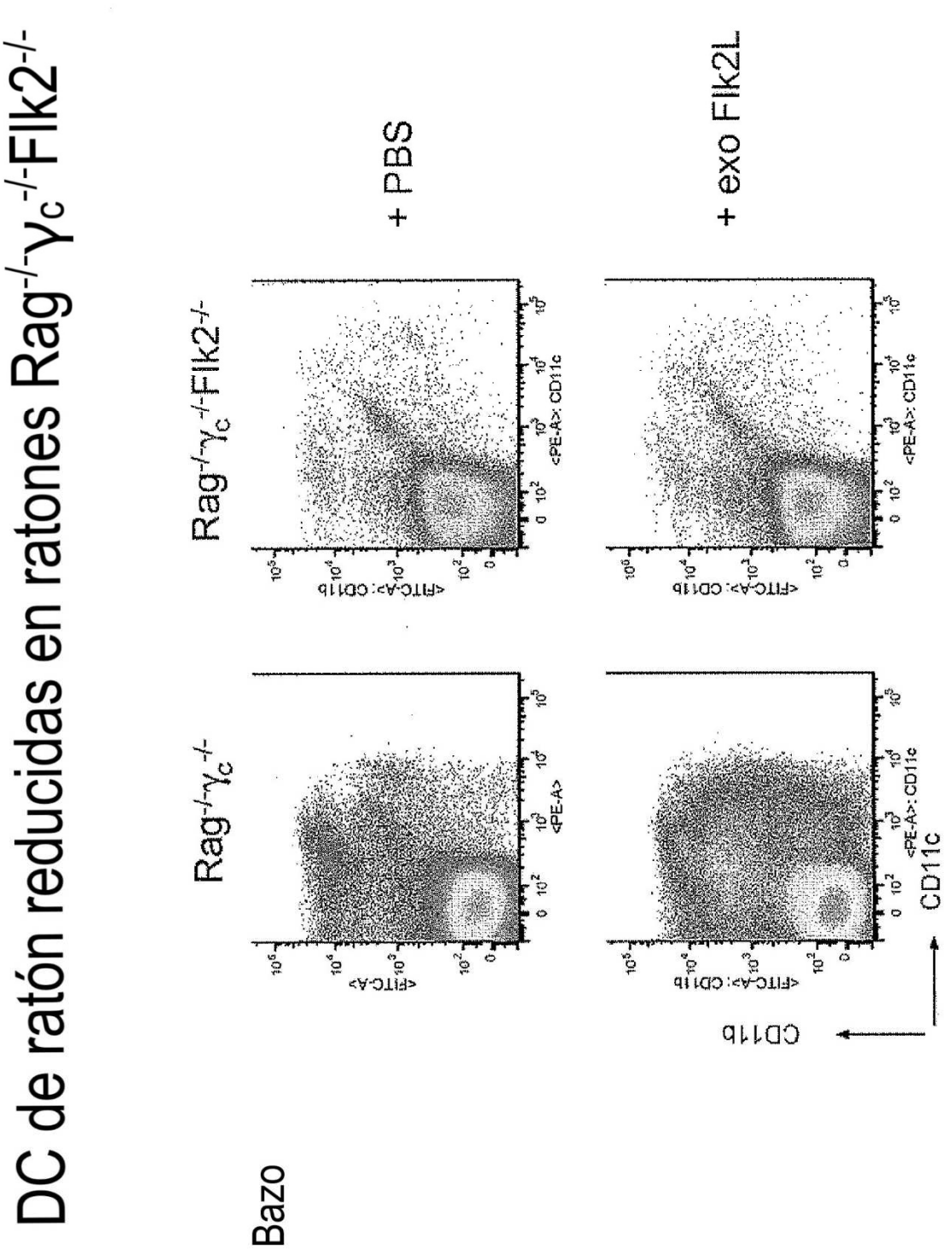
DC de ratón reducidas en ratones Rag-/-γc-/-Flk2-/-
Bazo
Rag-/-γc-/-
Rag-/-γc-/-Flk2-/-
+ PBS
+ exo Flk2L
CD11b
CD11c

Figura 2

Se desarrollan más DC humanas en ratones con HIS hechos en receptores Rag$^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ deficientes en Flk2

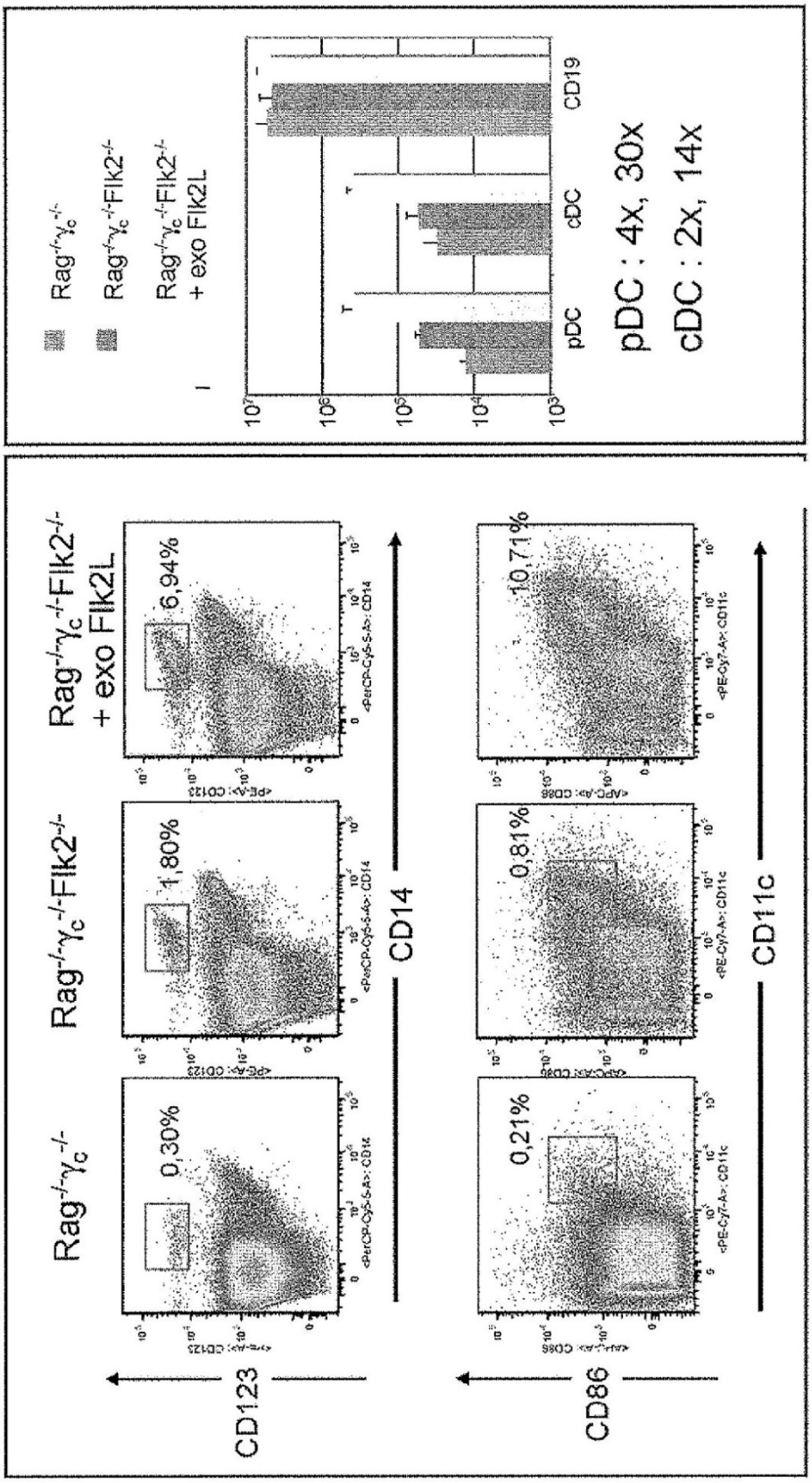

Figura 3b

Figura 3a

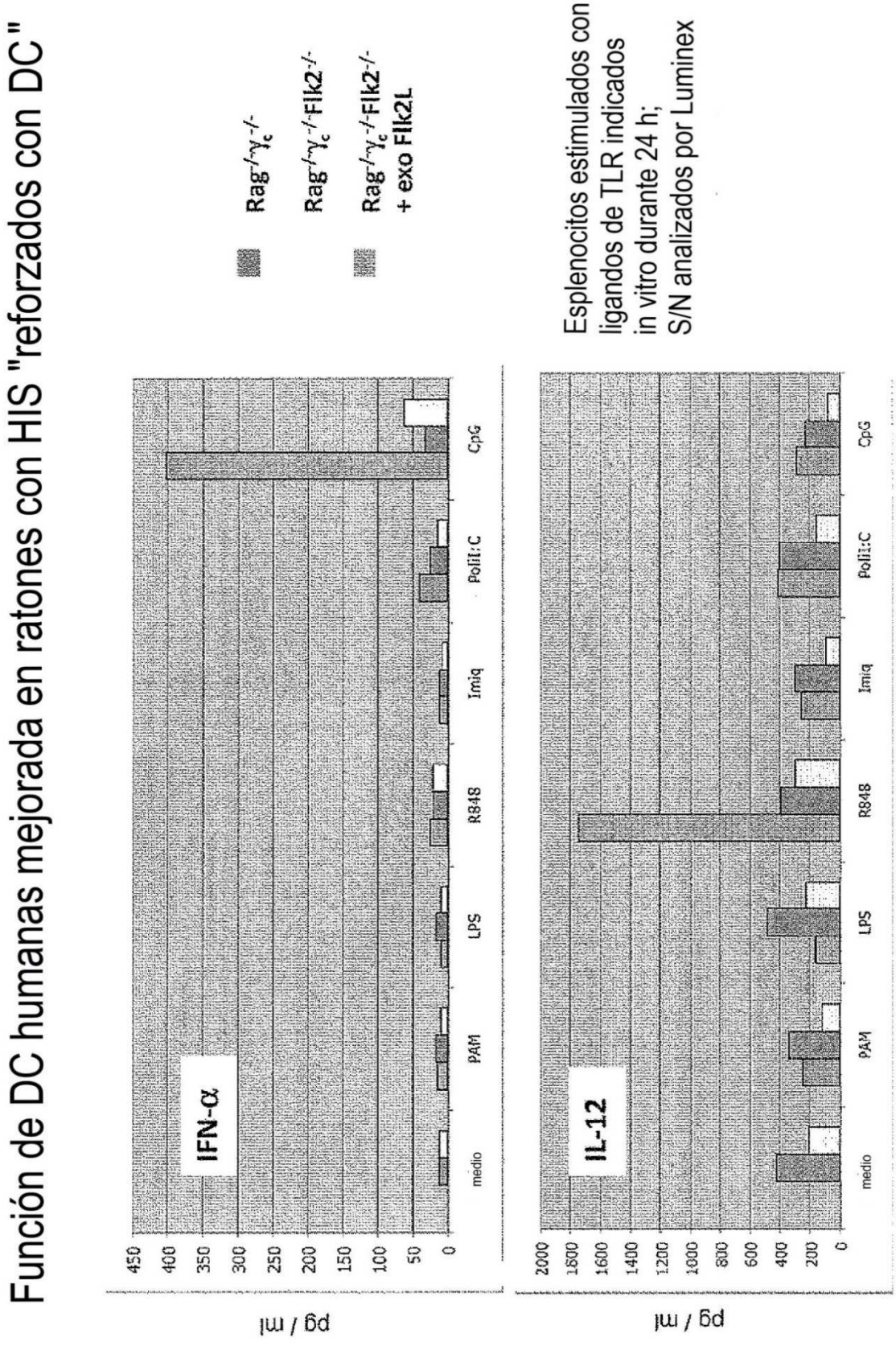
Función de DC humanas mejorada en ratones con HIS "reforzados con DC"
Rag-/-γc-/-
Rag-/-γc-/-Flk2-/-
Rag-/-γc-/-Flk2-/-
+ exo Flk2L
Esplenocitos estimulados con
ligandos de TLR indicados
in vitro durante 24 h;
S/N analizados por Luminex
IFN-α
IL-12
pg / ml
medio
PAM
LPS
R848
Imiq
Poli:C
CpG

Figura 4

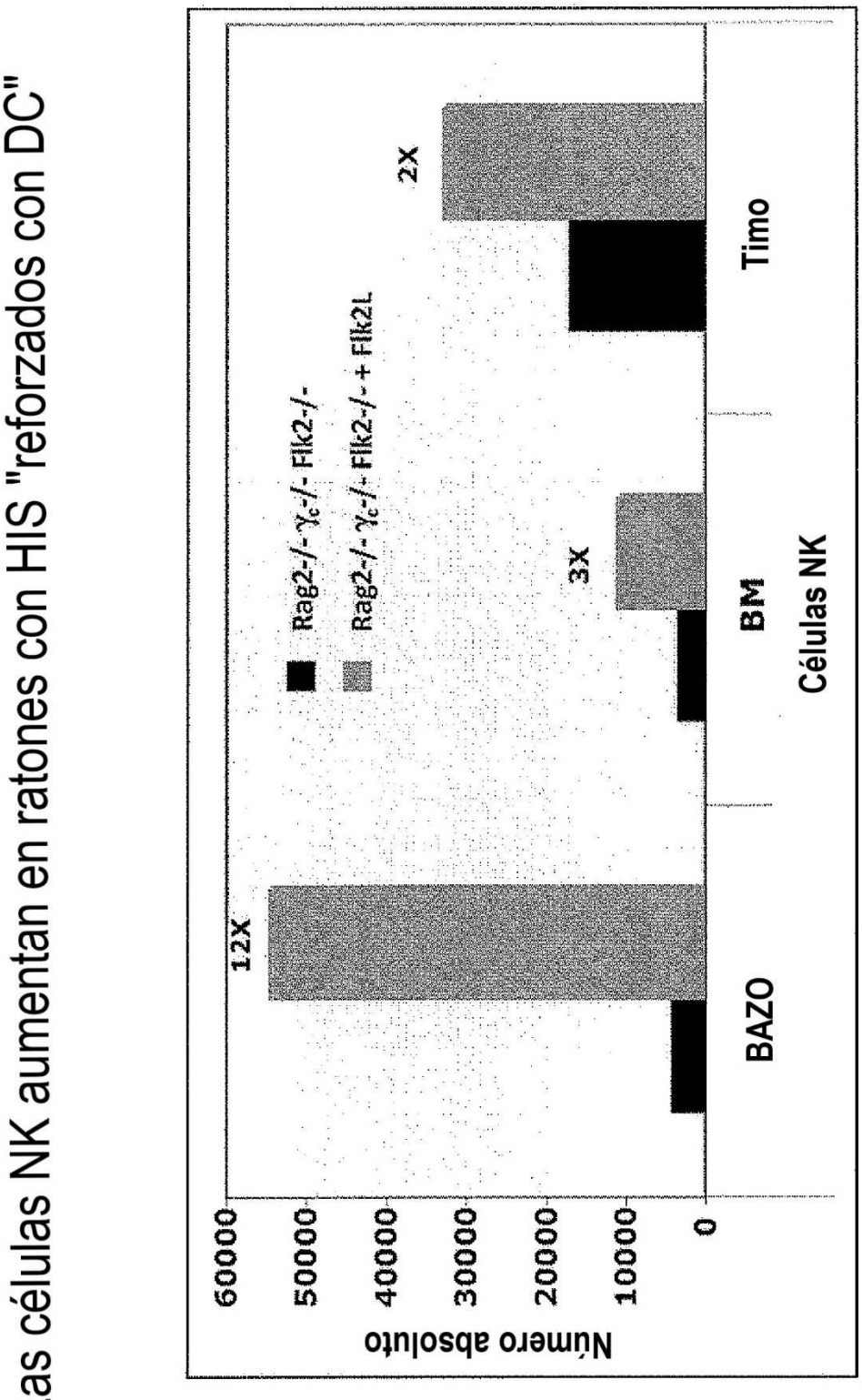
Las células NK aumentan en ratones con HIS "reforzados con DC"
Número absoluto
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Rag2-/- γc-/- Flk2-/-
Rag2-/- γc-/- Flk2-/- + Flk2L
12X
3X
2X
BAZO
BM
Timo
Células NK

Figura 5