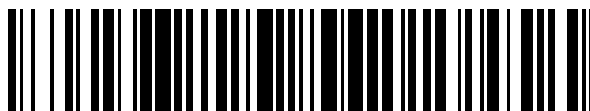


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 829**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2012 PCT/US2012/052306**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13032918**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2012 E 12828793 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 2747551**

54 Título: **Ratas deficientes en fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH) e inmunodeficientes y usos de las mismas**

30 Prioridad:

26.08.2011 US 201161527865 P

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

06.11.2020

73 Titular/es:

**YECURIS CORPORATION (100.0%)
15055 SW Sequoia Pkwy 130
Tigard, OR 97224, US**

72 Inventor/es:

**BIAL, JOHN R.;
WILSON, ELIZABETH M. y
GEURTS, ARON M.**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 791 829 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

Ratas deficientes en fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH) e inmunodeficientes y usos de las mismas

Listado de secuencias

5 Las secuencias nucleicas y de aminoácidos se enumeran en la secuencia adjunta. Sólo se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida en cualquier referencia a la cadena mostrada. En el listado de secuencias adjunto: La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de una porción de la proteína FAH de rata; La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de nucleótidos del casete dirigido del gen Fah de rata; Las SEQ ID NO: 3-20 son secuencias de nucleótidos de cebadores; La SEQ ID NO: 21 es la secuencia de nucleótidos de una porción del gen Fah de rata de tipo salvaje; La SEQ ID NO: 22 es la secuencia de aminoácidos de la proteína FAH de tipo salvaje; La SEQ ID NO: 23-25 son secuencias de aminoácidos de mutantes m1-m3; La SEQ ID NO: 26 es la secuencia de aminoácidos de una porción del gen Il2rg de tipo salvaje; La SEQ ID NO: 27 es la secuencia de aminoácidos de una porción del gen Rag2 de tipo salvaje; La SEQ ID NO: 28 es la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y la SEQ ID NO: 29 es la secuencia de aminoácidos de anakinra.

Antecedentes de la invención

15 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a modelos de rata que tienen una deficiencia hepática y/o una inmunodeficiencia y su uso. Esta divulgación también se refiere a procedimientos para usar tales modelos animales, incluyendo hepatocitos heterólogos en expansión, tales como hepatocitos humanos, en tales modelos animales.

Descripción de la técnica relacionada

20 El hígado es el sitio principal para el metabolismo de los compuestos xenobióticos, incluidos los medicamentos. Debido a que muchas enzimas hepáticas son específicas de la especie, es necesario evaluar el metabolismo de los productos farmacéuticos candidatos utilizando hepatocitos humanos primarios cultivados o su fracción microsómica. Si bien las fracciones de hepatocitos microsómicos se pueden usar para dilucidar algunas funciones metabólicas, otras pruebas dependen de los hepatocitos vivos. Algunos compuestos, por ejemplo, inducen enzimas hepáticas y, por lo tanto, su metabolismo cambia con el tiempo. Para analizar la inducción enzimática, los hepatocitos no solo deben ser viables, sino totalmente diferenciados y funcionales.

30 Los hepatocitos humanos son ampliamente utilizados por la industria farmacéutica durante el desarrollo preclínico de fármacos. Su uso es obligatorio por la FDA como parte del desarrollo de medicamentos. Para el metabolismo de medicamentos y otros estudios, los hepatocitos generalmente se aíslan de donantes de órganos cadavéricos y se envían al lugar donde se realizarán las pruebas. La condición (viabilidad y estado de diferenciación) de los hepatocitos de fuentes cadavéricas es muy variable y muchas preparaciones celulares son de calidad marginal. La disponibilidad de hepatocitos humanos de alta calidad se ve obstaculizada por el hecho de que no pueden expandirse significativamente en el cultivo de tejidos. Después de sembrar, las células sobreviven pero no se dividen. Los hepatocitos de especies de mamíferos fácilmente disponibles, tal como de ratón, no son adecuados para la prueba de fármacos porque tienen un complemento diferente de enzimas metabólicas y responden de manera diferente en los estudios de inducción. Las células hepáticas humanas inmortales (hepatomas) o los hepatoblastos fetales tampoco son un reemplazo adecuado para las células adultas completamente diferenciadas. Los hepatocitos humanos también son necesarios para estudios en el campo de la microbiología. Muchos virus humanos, tales como los virus que causan hepatitis, no se pueden replicar en ningún otro tipo de célula.

40 Por otra parte, los dispositivos bioartificiales de asistencia hepática, que usan hepatocitos *ex vivo*, se han utilizado para ayudar a pacientes con insuficiencia hepática aguda. Además, se han llevado a cabo varios ensayos clínicos de trasplante de hepatocitos, que proporcionaron una prueba de principio de que el trasplante de hepatocitos puede ser beneficioso. En la actualidad, los hepatocitos humanos no pueden expandirse significativamente en cultivo. Los hepatocitos derivados de células madre en cultivo son inmaduros y generalmente carecen de funcionalidad completa.

45 Por lo tanto, todos los hepatocitos en uso hoy en día se derivan de donantes humanos, muestras cadavéricas o quirúrgicas, lo que limita significativamente la disponibilidad de hepatocitos. Si hubiera suficientes hepatocitos humanos disponibles, los dispositivos bioartificiales de asistencia hepática se convertirían en una tecnología viable y el trasplante de hepatocitos humanos podría encontrar un uso generalizado. Dadas estas limitaciones, los procedimientos de expansión de hepatocitos humanos primarios son altamente deseables. También hay una necesidad en la industria de la salud animal de procedimientos para expandir los hepatocitos de otras especies, tales como perros, caballos, etc. para investigación y estudio.

55 El documento WO 2010/127275 A1 desvela un procedimiento para expandir hepatocitos humanos en ratones inmunodeficientes defectivos para Fah y un trasplante en serie de hepatocitos. Azuma H y col., (2007), Nature Biotechnology, Nature Publishing Group, EE.UU., Vol. 25, N.º 8, páginas 903-910 también desvelan un procedimiento para expandir los hepatocitos en ratones inmunodeficientes defectivos para Fah y señala la utilidad de tal modelo animal para probar la toxicidad de los metabolitos del fármaco y para evaluar los patógenos que dependen de las células hepáticas humanas para la replicación.

Sumario

5 En el presente documento se describen ratas que tienen utilidad para diversos fines, incluso para la expansión de hepatocitos de otras especies (particularmente seres humanos) y como modelos animales de enfermedades hepáticas, incluyendo cirrosis, carcinoma hepatocelular e infección hepática. En general, las ratas tienen hígados disfuncionales ("deficiencia hepática"), daño hepático inducido y/o una inmunodeficiencia, como se describe con más detalle en el presente documento.

10 En el presente documento se proporcionan procedimientos para expandir hepatocitos heterólogos, y particularmente hepatocitos humanos *in vivo*. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye trasplantar hepatocitos heterólogos en una rata con deficiencia de Fah y permitir que se expandan los hepatocitos heterólogos. La rata deficiente en Fah es inmunodeprimida o inmunodeficiente. En algunas realizaciones, a la rata con deficiencia de Fah se le administra un vector que codifica uroquinasa antes del trasplante de los hepatocitos heterólogos.

También se desvelan hepatocitos aislados (tales como hepatocitos humanos) expandidos y recogidos de ratas con deficiencia de Fah y/o inmunodeficientes.

15 También se proporcionan ratas genéticamente modificadas cuyos genomas son homocigóticos para una interrupción en el gen *Fah* de tal manera que la interrupción da como resultado la pérdida de expresión de la proteína FAH funcional, en el que las ratas exhiben una función hepática disminuida. En algunos ejemplos, las ratas con deficiencia de Fah incluyen además hepatocitos heterólogos trasplantados. En algunos casos, la rata deficiente en Fah está inmunodeprimida.

Además se desvelan células madre embrionarias de rata aisladas que comprenden una alteración en el gen *Fah*.

20 También se desvelan procedimientos para producir una célula de rata con deficiencia de Fah mediante diversos procedimientos que incluyen recombinación homóloga usando el vector AAV-DJ, así como TALEN.

También se desvelan procedimientos de uso de los modelos de rata para el análisis *in vivo* de la enfermedad hepática humana, candidatos a fármacos y xenobióticos.

25 Las características y ventajas anteriores y otras se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias realizaciones, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

30 La figura 1 es un esquema del gen rFAH de tipo salvaje que incluye el intrón 2-3 y el intrón 3-4, junto con la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) con la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEQ ID NO:28) y cebadores de PCR. Las secuencias adyacentes a los intrones en el esquema indican la secuencia incluida en el casete de orientación rFah KO. Las secuencias externas indican secuencias que se encuentran fuera de la secuencia objetivo, pero son parte del gen rFah.

La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra la construcción de direccionamiento Fah de rata que contiene la región de homología 5' de 1,5 kb y la región de homología 3' de 1,5 kb flanqueada por el casete de selección de 1,7 kb PGK:NEO;

35 la figura 3 es un diagrama esquemático del gen Fah de rata con el casete KO dirigido integrado que contiene la secuencia PGK:NEO;

la figura 4 es un esquema del gen rFah con el casete KO dirigido integrado que contiene la secuencia PGK:NEO. Las flechas indican los sitios de unión del cebador y los corchetes indican el producto de PCR completo. Los pares de cebadores de PCR de 5' y 3' contienen un cebador que se hibrida al gen rFah fuera de la secuencia objetivo y un segundo cebador que se hibrida a la secuencia PGK:NEO. Cada reacción de PCR contenía 0,1 ng de ADNg y 2 μ M de cada cebador de PCR. las temperaturas de desnaturalización, hibridación y extensión junto con los números de ciclo se optimizaron para cada conjunto de cebadores;

45 la figura 5 muestra (A) una fotografía de las reacciones de PCR 5' y 3' para cada clon potencial rFah KO ES clon 11-19. Se indican los pesos moleculares previstos de cada par de cebadores. Los clones 14, 17 y 19 no parecen contener el casete rFah KO integrado; y (B) una fotografía de los productos de PCR de todos los clones de ES utilizando cebadores de rFah fuera del sitio de integración;

50 la figura 6 muestra (A) un esquema del gen rFah WT y el genoma KO de la región objetivo. Las flechas y el corchete indican el producto de PCR marcado con 32 P utilizado para hibridar la transferencia Southern; y (B) una imagen de transferencia Southern. Quince μ g de ADN genómico de cada clon de ES se digirieron con endonucleasa de restricción Bgl II durante la noche a 37 °C. Los productos digeridos se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa:TBE al 0,7 %, el ADN fue expuesto a depuración ácida antes de la transferencia capilar a la membrana de nylon con tampón de transferencia alcalina. La membrana se hibridó con una sonda marcada con 32 P del producto de PCR indicado en A y B;

55 la figura 7 muestra imágenes de (A) tinción positiva de FAH (rojo) de un grupo de hepatocitos humanos dentro del hígado de rata 29; y (B) tinción positiva para FAH (rojo) de hepatocitos humanos dentro del hígado del control de ratón FRG KO;

la figura 8 es (A) un esquema de un par de TALEN diseñados para atacar e interrumpir secuencias en el exón 3 del gen *Fah* de rata (acceso en GenBank NM_017181); (B) la secuencia objetivo TALEN de tipo salvaje con sitios

de unión de TALEN específicos subrayados y en mayúsculas (SEQ ID NO: 21);

la figura 9 es la secuencia de aminoácidos del tipo salvaje y las mutaciones identificadas en el Ejemplo 6 SEQ ID NO: 22-25);

5 la figura 10 son las secuencias de codificación de TALEN dirigidas de la rata *Rag2* y los genes *Ii2rg* ligados al cromosoma X inyectados en embriones SS y SD para alterar ambos genes en ambas cepas en el Ejemplo 6 (SEQ ID NO: 26). La secuencia de tipo salvaje de cada sitio diana se muestra con los sitios de unión al monómero TALEN subrayadas;

10 Las figuras 11 y 12 muestran fenotipos inmunes de animales nulos (SS-*Ii2rg*-m1^{-y} y SS-*Rag2*-m1^{-y} machos) que revelan deficiencias de linfocitos T CD3⁺ (círculos verdes), Linfocitos B CD45RA⁺ (círculos azules) en ambas cepas, y células CD3⁻/CD161a^{HIGH} NK (círculos rojos) específicamente en los animales nulos *Ii2rg*;

la figura 13 es una tabla de genotipos de crías de rata nacidas vivas de reproducciones heterocigóticas de Fah;

la figura 14 es la tinción tricrómica de tejido fijado de un SS-Fah-m1^{-/-} de 9 semanas de edad después de 8 días de abstinencia de NTBC que muestra evidencia de etapas tempranas de disfunción hepática evidente como (flechas) en comparación con un animal endogámico SS de control de edad similar en NTBC; y

15 la figura 15 es la tinción tricrómica de tejido fijo de un SS-Fah-m1^{-/-} de 9 semanas de edad después de 8 días de abstinencia de NTBC que muestra evidencia de etapas tempranas de lesión renal en comparación con un animal endogámico SS de control de una edad similar en NTBC.

Descripción detallada

I. Términos y procedimientos

20 A menos que se indique otra cosa, los términos técnicos se utilizan según el uso convencional. Pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew y col., (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). Para facilitar la

25 revisión de las diversas realizaciones de la divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

Vector AAV-DJ: Un auxiliar de empaquetado del virus adenoasociados (AAV) que expresa una cápside híbrida que contiene las proteínas de la cápside AAV2, AAV5 y AAV8 y la proteína rep AAV2. (Grimm y col., *J Virol* 82:5887, 2008; patente de Estados Unidos n.º 7,588,772; publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2010/0047174).

30 Administración: Para proporcionar o dar a un sujeto un agente, tal como un agente terapéutico, por cualquier vía efectiva. Las vías de administración de ejemplo incluyen, pero sin limitación, inyección (tal como subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal e intravenosa), oral, intraductal, sublingual, rectal, transdérmica, intranasal, vaginal y de inhalación.

35 El agente que inhibe o previene o evita el desarrollo de enfermedad hepática: Un compuesto o composición que cuando se administra a una rata con deficiencia de Fah, previene, evita, retrasa o inhibe el desarrollo de enfermedad hepática en el animal. La enfermedad hepática o la disfunción hepática se caracteriza por cualquiera de una serie de signos o síntomas, incluyendo, pero sin limitación, una alteración en la histología hepática (tal como necrosis, inflamación, fibrosis, displasia o cáncer hepático), una alteración en los niveles de enzimas específicas del hígado y otras proteínas (tales como, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, bilirrubina, fosfatasa alcalina y albúmina), plasma o succinilacetona urinaria (SA), o insuficiencia hepática generalizada. En algunas realizaciones, el

40 agente que inhibe la enfermedad hepática es un inhibidor farmacológico de la 4-OH-fenilpiruvato dioxigenasa, tal como 2-(2-nitro-4-trifluoro-metil-benzoil)-1,3ciclohexanodiona (NTBC) o metil-NTBC. En un ejemplo no limitante, El agente que inhibe la enfermedad hepática es el NTBC.

45 Anakinra: Un antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1). Anakinra bloquea la actividad biológica de la IL-1 natural al inhibir competitivamente la unión de IL-1 al receptor de IL-1, que se expresa en muchos tejidos y órganos. La IL-1 se produce en respuesta a estímulos inflamatorios y media varias respuestas fisiológicas, incluyendo reacciones inflamatorias e inmunológicas. Anakinra es una versión no glicosilada recombinante, de IL-1RA humano (antagonista del receptor de IL-1) preparado a partir de cultivos de *Escherichia coli* genéticamente modificada. La proteína anakinra tiene 153 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 17,3 kD y difiere del IL-1RA humano nativo en que tiene un solo resto de metionina en su extremo amino (la secuencia de aminoácidos de anakinra se establece en el presente documento como la SEQ ID NO:29). Anakinra también se conoce como KINERET™.

55 Azatioprina: Un inmunosupresor que es un inhibidor de la síntesis de purinas, que inhibe la proliferación de células, especialmente leucocitos. Este inmunosupresor se usa a menudo en el tratamiento de enfermedades autoinmunes o en el rechazo de trasplantes de órganos. Es un profármaco, convertido en el cuerpo en los metabolitos activos 6-mercaptopurina (6-MP) y ácido 6-tioinosínico. La azatioprina es producida por varios fabricantes de genéricos y como nombres de marca (Azasan™ de Salix; Imuran™ de GlaxoSmithKline; Azamun™; e Imurel™).

Muestra biológica: Una muestra obtenida de las células, tejido o fluido corporal de un sujeto, tal como sangre periférica, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, médula ósea, orina, saliva, biopsia de tejido, muestra quirúrgica y material de autopsia. También se hace referencia en el presente documento como una "muestra".

Cirrosis: Se refiere a un grupo de enfermedades hepáticas crónicas caracterizadas por la pérdida de la arquitectura lobular microscópica normal y el reemplazo regenerativo del tejido parenquimatoso necrótico con bandas fibrosas de tejido conectivo que eventualmente constriñen y dividen el órgano en nódulos irregulares. La cirrosis tiene un largo período de latencia, generalmente seguido de dolor abdominal repentino e hinchazón con hematemesis, edema dependiente o ictericia. En estadios avanzados puede haber ascitis, ictericia pronunciada, hipertensión portal, venas varicosas y trastornos del sistema nervioso central que pueden terminar en coma hepático.

Recolección: Tal como se usa en el presente documento, "recolectar" hepatocitos heterólogos expandidos se refiere al procedimiento de extracción de los hepatocitos expandidos de una rata a la que se han inyectado o trasplantado hepatocitos heterólogos aislados (también conocida como rata receptora). La recolección opcionalmente incluye separar los hepatocitos de otros tipos de células. En una realización, los hepatocitos heterólogos expandidos se recogen del hígado de una rata.

Cadena y común del receptor de interleucina (*Il2rg*): Un gen que codifica la cadena gamma común de los receptores de interleucina. *Il2rg* es un componente de los receptores para varias interleucinas, incluyendo IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 (Di Santo y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:377 -381, 1995). Los animales deficientes en *Il2rg* exhiben una reducción de los linfocitos B y los linfocitos T y carecen de linfocitos citolíticos naturales. También se conoce como cadena gamma del receptor de interleucina-2.

Crioconservado: Tal como se usa en el presente documento, "crioconservado" se refiere a una célula (como un hepatocito) o tejido que ha sido conservado o mantenido por enfriamiento a bajas temperaturas bajo cero, tal como 77 K o -196 °C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido). A estas bajas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que conducirían a la muerte celular, se detiene efectivamente.

Ciclosporina A: Un compuesto inmunosupresor que es un péptido cíclico no ribosómico de 11 aminoácidos producido por el hongo del suelo *Beauveria nivea*. La ciclosporina A se usa para la profilaxis del rechazo del injerto en el trasplante de órganos y tejidos. La ciclosporina A también se conoce como ciclosporina y ciclosporina.

Disminución de la función hepática: Un cambio anormal en una cualquiera de una serie de parámetros que miden la salud o la función del hígado. La disminución de la función hepática también se denomina en el presente documento "disfunción hepática". La función hepática puede evaluarse por cualquiera de los diversos medios bien conocidos en la técnica, tales como, pero sin limitación, examen de histología hepática y medición de enzimas hepáticas u otras proteínas. Por ejemplo, la disfunción hepática puede estar indicada por necrosis, inflamación, fibrosis, daño oxidativo o displasia del hígado. En algunas ocasiones, la disfunción hepática está indicada por cáncer hepático, tal como carcinoma hepatocelular. Los ejemplos de enzimas y proteínas hepáticas que se pueden analizar para evaluar la disfunción hepática incluyen, pero sin limitación, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), bilirrubina, fosfatasa alcalina y albúmina. La disfunción hepática también puede provocar insuficiencia hepática generalizada. Los procedimientos para evaluar la función hepática son bien conocidos en la técnica, tales como los enseñados por Grompe y col. (Genes Dev. 7:2298-2307, 1993) y Manning y col., (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:11928 -11933, 1999).

Deficiente: Tal como se usa en el presente documento, "Deficiente en Fah" o "deficiente en Fah" se refiere a un animal, tal como una rata, que tiene una disminución sustancial o la ausencia de producción o actividad de la enzima FAH, por ejemplo, un animal que tiene una interrupción en el gen *Fah* (como una inserción, eliminación o una o más mutaciones puntuales), lo que da como resultado una disminución sustancial de, o la ausencia de, expresión del ARNm de *Fah* y/o actividad funcional de la enzima FAH. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "pérdida de expresión" de la proteína FAH funcional no se refiere solo a una pérdida completa de expresión, sino también incluye una disminución sustancial en la expresión de la proteína FAH funcional, tal como una disminución de aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 99 %. En algunas realizaciones, la rata con deficiencia de Fah comprende inserciones heterocigóticas u homocigóticas en el gen *Fah* (tal como una inserción que incluye un codón de terminación en el marco), siendo particularmente preferidas las inserciones homocigóticas. En algunas realizaciones, la inserción es en el exón 3 de *Fah*. En algunas realizaciones, la rata deficiente en Fah comprende delecciones heterocigóticas u homocigóticas en el gen *Fah*, siendo particularmente preferidas las delecciones homocigóticas. Como ejemplo, la delección está en el exón 3 de *Fah*. En otra realización, la rata deficiente en Fah comprende una o más mutaciones puntuales en el gen *Fah*. En la técnica se conocen ejemplos de mutaciones puntuales de *Fah* adecuadas (véase, por ejemplo, Aponte y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98(2):641-645, 2001).

Deplecionar: Reducir o eliminar. Por ejemplo, "depleción de macrófagos" se refiere al procedimiento de eliminación, retirada, reducción o destrucción de macrófagos en un animal. Un animal con depleción de macrófagos no está necesariamente desprovisto de macrófagos, pero al menos muestra una reducción en el número o la actividad de los macrófagos. En una realización, la depleción de macrófagos da como resultado al menos un 10 %, al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 75 %, al menos un 90 % o un 100 % de reducción de macrófagos funcionales.

Interrupción: Tal como se usa en el presente documento, una "interrupción" en un gen se refiere a cualquier inserción, delección o mutación puntual, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la interrupción conduce a una pérdida parcial o completa de la expresión de ARNm y/o proteína funcional.

Injertar: Implantar células o tejidos en un animal. Tal como se usa en el presente documento, el injerto de hepatocitos heterólogos en una rata receptora se refiere al procedimiento de implantación de hepatocitos heterólogos en la rata receptora después de la inyección. Los hepatocitos heterólogos injertados son capaces de expandirse en la rata receptora.

- 5 Expandir: Aumentar en cantidad. Tal como se usa en el presente documento, los hepatocitos heterólogos "en expansión" se refieren al procedimiento de permitir que se produzca la división celular de manera que los hepatocitos proliferen activamente *in vivo* y el número de hepatocitos heterólogos aumenta en comparación con el número original de hepatocitos heterólogos trasplantados en la rata receptora.

Feto: La descendencia no nacida de un animal en el período postembrionario.

- 10 FK506: FK506, también conocido como tacrolimus o fujimicina, es un medicamento inmunosupresor. FK506, una lactona macrólido de 23 miembros descubierta por primera vez en el caldo de fermentación de una muestra de suelo japonesa que contenía la bacteria *Streptomyces tsukubaensis*. Este compuesto a menudo se usa después del trasplante alogénico de órganos para reducir la actividad del sistema inmunitario del paciente y disminuir el riesgo de rechazo de órganos. FK506 reduce la actividad de los linfocitos T y la interleucina-2. También se usa en una preparación tópica en el tratamiento de la dermatitis atópica severa (eccema), la uveítis refractaria severa después de los trasplantes de médula ósea y el vitíligo como alteración de la piel.

Fludarabina: Un análogo de purina que inhibe la síntesis de ADN. La fludarabina a menudo se usa como un fármaco quimioterapéutico para el tratamiento de diversas neoplasias hematológicas.

- 20 Ratón KO FRG: Un ratón mutante que tiene deleciones homocigóticas en la fumarilacetoacetato hidrolasa (*Fah*), gen de activación de recombinación 2 (*Rag2*) y deleciones hemicigotas u homocigóticas de la cadena y común del gen ligado al receptor de interleucina (*Il2rg*) x. También conocido como *Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}* o *Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{fl/y}*. Tal como se usa en el presente documento, las deleciones homocigóticas en los genes *Fah*, *Rag2* y *Il2rg* indica que no se expresan proteínas FAH, RAG-2 e IL-2R γ funcionales en ratones que comprenden las mutaciones.

- 25 Fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH): Una enzima metabólica que cataliza la última etapa del catabolismo de la tirosina. Los ratones que tienen una deleción homocigótica del gen *Fah* exhiben una expresión alterada del ARNm del hígado y una disfunción hepática grave (Grompe y col. Genes Dev. 7:2298 -2307, 1993). También se ha demostrado que las mutaciones puntuales en el gen *Fah* causan insuficiencia hepática y letalidad posnatal (Aponte y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98(2):641-645, 2001). Los humanos con deficiencia de *Fah* desarrollan la enfermedad hepática tirosinemia hereditaria tipo 1 (HT1) y desarrollan insuficiencia hepática. La deficiencia de *Fah* conduce a la acumulación de fumarilacetoacetato, un potente agente oxidante y esto finalmente conduce a la muerte celular de los hepatocitos deficientes para *Fah*. Por tanto, las ratas con deficiencia de *Fah* pueden repoblar con hepatocitos de otras especies, incluidos los seres humanos. El *Fah* genómico, el ARNm y las secuencias de proteínas para varias especies diferentes están disponibles públicamente, tal como en la base de datos GenBank (ver, por ejemplo, ID del gen 29383 (*Fah* de rata); ID del gen 14085 (*Fah* de ratón); ID del gen 610140 (FAH de perro); ID del gen 415482 (FAH de pollo); ID del gen 100049804 (FAH de caballo); ID del gen 712716 (FAH de macaco rhesus); ID del gen 100408895 (FAH de tití); ID del gen 100589446 (FAH de gibón); ID del gen 467738 (FAH de chimpancé); e ID del gen 508721 (FAH de vaca)).

Patógeno hepático: Se refiere a cualquier patógeno, tal como un patógeno bacteriano, vírico o parasitario, que infecta las células del hígado. En algunas realizaciones, el patógeno hepático es un "virus hepatotrópico" (un virus que se dirige al hígado), tal como el VHB o VHC.

- 40 Carcinoma hepatocelular (CHC): El CHC es una neoplasia maligna primaria del hígado que ocurre típicamente en pacientes con hígados inflamatorios como resultado de hepatitis viral, toxinas hepáticas o cirrosis hepática.

- 45 Hepatocito: Un tipo de célula que constituye el 70-80 % de la masa citoplasmática del hígado. Los hepatocitos participan en la síntesis de proteínas, el almacenamiento de proteínas y la transformación de carbohidratos, la síntesis de colesterol, sales biliares y fosfolípidos, y la detoxificación, modificación y excreción de sustancias exógenas y endógenas. El hepatocito también inicia la formación y secreción de bilis. Los hepatocitos fabrican seroalbúmina, fibrinógeno y el grupo de protrombina de factores de coagulación, y son el sitio principal para la síntesis de lipoproteínas, ceruloplasmina, transferrina, complemento y glicoproteínas. Además, los hepatocitos tienen la capacidad de metabolizar, detoxificar e inactivar compuestos exógenos, tales como medicamentos e insecticidas, y compuestos endógenos, tales como esteroides.

- 50 Progenitor de hepatocitos: Cualquier tipo de célula capaz de dar lugar a un hepatocito. Los ejemplos de progenitores de hepatocitos incluyen, pero sin limitación, células madre embrionarias (ESC), células madre pluripotenciales inducidas (iPSC), células madre intrahepáticas adultas, células madre mesenquimatosas y células madre amnióticas. En el contexto de la presente divulgación, los procedimientos para expandir los hepatocitos heterólogos *in vivo* incluyen el trasplante de hepatocitos heterólogos o progenitores de hepatocitos.

- 55 Tirosinemia hereditaria tipo 1 (HT1): La tirosinemia es un error del metabolismo, generalmente innato, en el cual el cuerpo no puede descomponer efectivamente el aminoácido tirosina. La HT1 es la forma más grave de este trastorno y es causada por la escasez de la enzima fumarilacetoacetato de hidrolasa (FAH) codificada por el gen *Fah* encontrado

en el cromosoma humano número 15. La FAH es la última de una serie de cinco enzimas necesarias para descomponer la tirosina. Los síntomas de HT1 generalmente aparecen en los primeros meses de vida e incluyen la incapacidad para aumentar de peso y crecer a la velocidad esperada (incapacidad para prosperar), diarrea, vómitos, coloración amarillenta de la piel y el blanco de los ojos (ictericia), olor a col y mayor tendencia a sangrar (particularmente hemorragias nasales). La HT1 puede conducir a insuficiencia hepática y renal, problemas que afectan al sistema nervioso y un mayor riesgo de cáncer de hígado.

Heterólogo: Derivado de una fuente distinta de (es decir, ajena) la especie referenciada en contraste con el material derivado de, naturalmente asociado con, o nativo de, esa especie. En el caso de los modelos de rata en el presente documento, las ratas pueden ser trasplantadas e injertadas con hepatocitos de especies distintas de la rata receptora, tal como los seres humanos, perros, cerdos, etc.

heterocigótico: Que tiene alelos diferentes en los correspondientes loci cromosómicos. Por ejemplo, una rata heterocigótica para una mutación genética particular tiene la mutación en un alelo del gen pero no en el otro.

homocigótico: Generalmente significa que alelos idénticos en uno o más loci. Tal como se usa en el presente documento, "homocigótico" para interrupciones u "homocigótico" para una deficiencia se refiere a un organismo que tiene interrupciones (como una delección, inserción o mutación puntual) de ambos alelos de un gen, así como "heterocigosidad compuesta" en la cual el organismo puede tener interrupciones en dos alelos no relacionados, que, sin embargo, se comportan como una interrupción homocigótica, lo que da como resultado la pérdida de productos genéticos funcionales.

Humanizado: Tal como se usa en el presente documento, las referencias a animales (ratas) o hígados humanizados se refieren a animales o hígados trasplantados con hepatocitos humanos en los que los hepatocitos humanos se han expandido *in vivo* para repoblar sustancialmente el hígado del animal con hepatocitos humanos.

Inmunodeficiente: Falta de al menos una función esencial del sistema inmunitario. Tal como se usa en el presente documento, una rata "inmunodeficiente" es una que carece de componentes específicos del sistema inmunitario o que carece de la función de componentes específicos del sistema inmunitario (tal como, por ejemplo, linfocitos B, linfocitos T o células NK). En algunos casos, una rata inmunodeficiente carece de macrófagos. En algunas realizaciones, una rata inmunodeficiente comprende una o más alteraciones genéticas que previenen o inhiben el desarrollo de células inmunes funcionales (tales como linfocitos B, linfocitos T o células NK). En algunas realizaciones, la alteración genética se selecciona del grupo que consiste en la deficiencia del gen 1 de activación de recombinación (*Rag1*), deficiencia del gen 2 de activación de la recombinación (*Rag2*), deficiencia de la cadena gamma del receptor de interleucina-2 (*Il2rg*), la mutación *Dnapk^{-/-}* (SCID), el genotipo SIRP-alfa humanizado/humanizado, la mutación de rata desnuda, deficiencias de perforina y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el reemplazo del gen *Sirp-α^{hum/hum}* de rata con secuencia humana, es decir, humanización (*hum*) *Sirp-α^{hum/hum}* bloqueará la activación de macrófagos de rata por células humanas. En algunas realizaciones, una "rata inmunodeficiente" comprende una o más de las siguientes alteraciones genéticas: *Rag1^{-/-}*, *Rag2^{-/-}*, *Il2rg^{-/-}*, *Il2rg^Δ*, SCID, Genotipo SIRP-alfa, perforina^{-/-}, y/o desnuda. Las cepas de animales inmunodeficientes son bien conocidas en la técnica y están disponibles comercialmente, tales como de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) o Taconic (Hudson, NY). En algunas realizaciones, la rata es una rata *Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}/Il1r1^{-/-}*, una rata *Fah^{-/-}/Rag1^{-/-}/Ilrg^{-/-}/Il1r1^{-/-}*, una rata *Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}/Il1r1^{-/-}* o una rata *Fah^{-/-}/Rag1^{-/-}/Il2rg^{-/-}/Il1r1^{-/-}*. En algunas realizaciones, una rata inmunodeficiente es un animal al que se le ha administrado uno o más inmunosupresores.

Inmunosupresor: Cualquier compuesto que disminuya la función o actividad de uno o más aspectos del sistema inmune, tal como un componente del sistema inmune humoral o celular o el sistema del complemento. Los inmunosupresores también se conocen como "agentes inmunosupresores". Los inmunosupresores de ejemplo incluyen, pero sin limitación: (1) antimetabolitos, tales como inhibidores de la síntesis de purinas (por ejemplo, azatioprina y ácido micofenólico), inhibidores de la síntesis de pirimidinas (por ejemplo, leflunomida y teriflunomida) y antifolatos (por ejemplo, metotrexato); (2) macrólidos, tal como FK506, ciclosporina A y pimecrolimus; (3) inhibidores de TNF-α, tales como talidomida y lenalidomida; (4) antagonistas del receptor de IL-1, tales como anakinra; (5) inhibidores diana de rapamicina en mamíferos (mTOR), tales como rapamicina (sirolimus), deforolimus, everolimus, temsirolimus, zotarolimus y biolimus A9; (6) corticosteroides, tales como prednisona; y (7) anticuerpos contra uno cualquiera de varios objetivos celulares o séricos. En realizaciones particulares de la divulgación, el inmunosupresor es FK506, ciclosporina A, fludarabina, micofenolato, prednisona, rapamicina o azatioprina, o combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de dianas celulares y sus respectivos compuestos inhibidores incluyen, pero no se limitan al componente 5 del complemento (por ejemplo, eculizumab); factores de necrosis tumoral (TNF) (por ejemplo, infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, afelimomab y golimumab); IL-5 (por ejemplo, mepolizumab); IgE (por ejemplo, omalizumab); BAYX (por ejemplo, nerelimumab); interferón (por ejemplo, faralimomab); IL-6 (por ejemplo, elsilimumab); IL-12 e IL-13 (por ejemplo, lebrikizumab y ustekinumab); CD3 (por ejemplo, Muromonab-CD3, otelixizumab, teplizumab, visilizumab); CD4 (por ejemplo, clenoliximab, keliximab y zanolimumab); CD11a (por ejemplo, efalizumab); CD18 (por ejemplo, erlizumab); CD20 (por ejemplo, afutuzumab, ocrelizumab, pascolizumab); CD23 (por ejemplo, lumiliximab); CD40 (por ejemplo, teneliximab, toralizumab); CD62L/l-selectina (por ejemplo, aselizumab); CD80 (por ejemplo, galiximab); CD147/basigina (por ejemplo, gavilimumab); CD154 (por ejemplo,

ruplizumab); BlyS (por ejemplo, belimumab); CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab, tremelimumab); CAT (por ejemplo, bertilimumab, lerdelimumab, metelimumab); integrina (por ejemplo, natalizumab); receptor de IL-6 (por ejemplo, tocilizumab); LFA-1 (por ejemplo, odulimumab); y receptor de IL-2/CD25 (por ejemplo, basiliximab, daclizumab, inolimumab).

5 Otros agentes inmunosupresores incluyen zolimomab aritox, atorolimumab, cedelizumab, dorlizumab, fontolizumab, gantenerumab, gomiliximab, maslimomab, morolimumab, pexelizumab, reslizumab, rovelizumab, sipilizumab, talizumab, telimomab aritox, vopaliximab, vepalimumab, globulina antitímocítica, globulina antilinfocítica; inhibidores de CTLA-4 (por ejemplo, abatacept, belatacept); aflibercept; alefacept; rilonacept; e inhibidores de TNF (por ejemplo, etanercept).

10 Inmunosupresión: Se refiere al acto de reducir la actividad o función del sistema inmune. La inmunosupresión puede lograrse mediante la administración de un compuesto inmunosupresor o puede ser el efecto de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, la inmunosupresión que resulta de la infección por VIH o debido a un defecto genético). En algunos casos, La inmunosupresión ocurre como resultado de una mutación genética que previene o inhibe el desarrollo de células inmunes funcionales.

15 Células madre de pluripotencia inducida (iPSC): Un tipo de célula madre pluripotenciales derivada artificialmente de una célula no pluripotencial, típicamente una célula somática adulta, induciendo la expresión de ciertos genes. Las iPSC pueden derivarse de cualquier organismo, tal como un mamífero. En algunos ejemplos, las iPSC se producen en ratones, ratas, conejos, cobayas, cabras, cerdos, vacas, de primates no humanos o de seres humanos. Las iPSC derivadas de ser humano son de ejemplo. Los iPSC son similares a las células ES en muchos aspectos, tal como la
 20 expresión de ciertos genes y proteínas de células madre, los patrones de metilación de cromatina, el tiempo de duplicación, formación de cuerpos embrioides, la formación de teratoma, la formación de quimera viable, y potencia y diferenciabilidad. Los procedimientos para producir iPSC son conocidos en la técnica. Por ejemplo, Las iPSC normalmente se obtienen por transfección de ciertos genes asociados a las células madre (tales como Oct-3/4 (Pou5f1) y Sox2) en células no pluripotenciales, tales como fibroblastos adultos. La transfección se puede lograr a través de
 25 vectores virales, tales como retrovirus, lentivirus o adenovirus. Por ejemplo, las células pueden transfectarse con Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc usando un sistema retroviral o con OCT4, SOX2, NANOG y LIN28 utilizando un sistema lentiviral. Después de 3-4 semanas, pequeñas cantidades de células transfectadas comienzan a ser morfológica y bioquímicamente similares a las células madre pluripotenciales y generalmente se aíslan mediante selección morfológica, tiempo de duplicación o a través de un gen indicador y selección con antibiótico. En un ejemplo, las iPSC de células humanas adultas se generan por el procedimiento de Yu y col., (Science 318(5854):1224, 2007) o Takahashi y col., (Cell 131(5):861-72, 2007). Las iPSC también se comocen como células iPS.

Carga infecciosa: Se refiere a la cantidad de un patógeno concreto en un sujeto o en una muestra del sujeto. La carga infecciosa se puede medir usando uno cualquiera de varios procedimientos conocidos en la técnica. El procedimiento
 35 seleccionado variará según el tipo de patógeno que se desea detectar y los reactivos disponibles para detectar el patógeno. La carga infecciosa también se puede medir, por ejemplo, determinando el título del patógeno, el procedimiento para el cual variará dependiendo del patógeno que se va a detectar. Por ejemplo, el título de algunos virus puede cuantificarse realizando un ensayo en placas. En algunos ejemplos, la carga infecciosa se mide cuantificando la cantidad de un antígeno específico de patógeno en una muestra. En otros ejemplos, la carga infecciosa se mide cuantificando la cantidad de una molécula de ácido nucleico específica del patógeno en una
 40 muestra. La cuantificación abarca la determinación de un valor numérico o puede ser un valor relativo.

Aislado: Un componente biológico "aislado", tal como un ácido nucleico, proteínas (incluidos los anticuerpos) u orgánulos, se ha separado o extraído sustancialmente de otros componentes biológicos en el medio ambiente (tal como una célula) en el que el componente está de forma natural, es decir, otros ácidos nucleicos cromosómicos y extracromosómicos, secuencias adyacentes, proteínas y orgánulos. Los ácidos nucleicos y proteínas que se han
 45 "aislado" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante procedimientos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparadas mediante expresión recombinante en una célula huésped, así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente. En cualquier caso, Los ácidos nucleicos y/o proteínas "aislados" dan como resultado nuevas entidades químicas que no se encuentran en la naturaleza.

Inhibidor de la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR): Una molécula que inhibe la expresión o la actividad de mTOR. Los inhibidores de mTOR incluyen, pero sin limitaciones, inhibidores de moléculas pequeñas, anticuerpos, péptidos y ácidos nucleicos. Por ejemplo, un inhibidor de mTOR puede ser una molécula que inhibe la actividad
 50 quinasa de mTOR o inhibe la unión de mTOR a un ligando. Los inhibidores de mTOR también incluyen moléculas que regulan por disminución la expresión de mTOR. En la técnica se conocen varios inhibidores de mTOR, incluyendo rapamicina (sirolimus).

Micofenolato: Un inmunosupresor que normalmente se usa para prevenir el rechazo de trasplantes alogénicos. Este fármaco generalmente se administra por vía oral o intravenosa. El micofenolato deriva del hongo *Penicillium stoloniferum*. Micofenolato mofetilo, la forma profármaco, se metaboliza en el hígado en el resto activo ácido micofenólico. Inhibe la inosina monofosfato deshidrogenasa, la enzima que controla la velocidad de síntesis del monofosfato de guanina en la ruta *de novo* de la síntesis de las purinas utilizada en la proliferación de linfocitos B y T.
 60 El ácido micofenólico normalmente se comercializa con los nombres comerciales CellCept™ (micofenolato mofetilo);

Roche) y Myfortic™ (micofenolato de sodio; Novartis).

NTBC (2-nitro-4-trifluoro-metil-benzoil)-1,3 ciclohexanodiona, también conocida como nitisinona): un inhibidor de la 4-hidroxi-fenilpiruvato dioxigenasa (HPPD). La HPPD cataliza la conversión de 4-hidroxifenilpiruvato en homogentisato, la segunda etapa en el catabolismo de la tirosina. El tratamiento con NTBC bloquea la vía del catabolismo de la tirosina en esta etapa y evita la acumulación de succinilacetona, un metabolito patognomónico que se acumula en seres humanos y animales con deficiencia de Fah.

Rata desnuda: Se refiere a una cepa de rata con una mutación genética que causa un timo deteriorado o ausente, dando como resultado un sistema inmunitario inhibido debido a un número muy reducido de linfocitos T.

Prednisona: Un corticosteroide sintético que es un inmunosupresor efectivo. A menudo se usa para tratar ciertas enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes y cánceres, así como para tratar o prevenir el rechazo de trasplantes de órganos. La prednisona generalmente se toma por vía oral, pero puede administrarse mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa. Es un profármaco que el hígado convierte en prednisolona, que es el fármaco activo y también un esteroide.

Rapamicina: Un compuesto con propiedades inmunosupresoras y antiproliferativas conocidas. La rapamicina, también conocida como sirolimus, es un macrólido que se descubrió por primera vez como producto de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. La rapamicina se une e inhibe la actividad de mTOR.

Receptor: Tal como se usa en el presente documento, una "rata receptora" es una rata a la que se le han inyectado hepatocitos heterólogos como se describe en el presente documento. Por lo general, una porción (el porcentaje puede variar) de hepatocitos heterólogos se injertan en la rata receptora. En algunos ejemplos, la rata receptora está inmunodeprimida o es inmunodeficiente. En algunos ejemplos, la rata receptora es deficiente en Fah.

Gen de activación de la recombinación 1 (*Rag1*): Un gen implicado en la activación de la recombinación de la inmunoglobulina V (D) J. La proteína RAG1 participa en el reconocimiento del sustrato de ADN, pero la actividad estable de unión y escisión también requiere RAG2. Las ratas deficientes en Rag-1 no tienen linfocitos B y T maduros.

Gen 2 de activación de la recombinación (*Rag2*): Un gen implicado en la recombinación de inmunoglobulinas y loci de receptores de linfocitos T. Las ratas deficientes en el gen *Rag2* no pueden sufrir una recombinación de V (D) J, lo que da como resultado una pérdida completa de linfocitos T funcionales (Shinkai y col., Cell 68: 855-867, 1992).

Trasplante en serie: El procedimiento para expandir los hepatocitos heterólogos *in vivo* en el que los hepatocitos expandidos en un primer animal se recogen y se trasplantan, tal como mediante inyección, en un animal secundario para su expansión posterior. El trasplante en serie puede incluir además animales terciarios, cuaternarios o adicionales.

Transferencia nuclear de células somáticas (SCNT): Una técnica de laboratorio para crear un embrión clonal, usando un óvulo con un núcleo donante. En la SCNT, se extrae el núcleo de una célula somática y se descarta el resto de la célula. Al mismo tiempo, se extrae el núcleo de un óvulo. A continuación, se inserta el núcleo de la célula somática en el óvulo enucleado. Después de su inserción en el huevo, el núcleo de la célula somática es reprogramado por la célula huésped. El huevo, que ahora contiene el núcleo de una célula somática, es estimulado con un shock y comenzará a dividirse. Después de muchas divisiones mitóticas en el cultivo, esta célula individual forma un blastocisto con ADN casi idéntico al organismo original.

Células madre: Una célula que tiene la capacidad única de producir células hijas inalteradas (autorrenovación; la división celular produce al menos una célula hija que es idéntica a la célula madre) y da lugar a tipos de células especializadas (potencia). Las células madre incluyen, pero sin limitación, células madre embrionarias (ES), células germinales embrionarias (EG), células madre de línea germinal (GS), células madre mesenquimatosas humanas (hMSC), células madre derivadas de tejido adiposo (ADSC), células progenitoras adultas multipotenciales (MAPC), células madre adultas multipotenciales de línea germinal (maGSC) y células madre somáticas no restringidas (USSC). El papel de las células madre *in vivo* es reemplazar las células que se destruyen durante la vida normal de un animal. En general, las células madre pueden dividirse sin límite. Después de la división, la célula madre puede permanecer como una célula madre, convertirse en una célula precursora o proceder a la diferenciación terminal. Una célula precursora es una célula que puede generar una célula funcional completamente diferenciada de al menos un tipo de célula dado. En general, las células precursoras pueden dividirse. Después de la división, una célula precursora puede seguir siendo una célula precursora o puede proceder a la diferenciación terminal. En un ejemplo, las células madre dan lugar a hepatocitos.

Agente terapéutico: Un compuesto químico, molécula pequeña u otra composición, tal como un compuesto antisentido, anticuerpos, inhibidor de la proteasa, hormona, quimiocina o citocina, capaz de inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado cuando se administra adecuadamente a un sujeto. Tal como se usa en el presente documento, un "agente candidato" es un compuesto seleccionado para la detección selectiva para determinar si puede funcionar como agente terapéutico para una enfermedad o trastorno en particular.

Título: En el contexto de la presente divulgación, título se refiere a la cantidad de un patógeno concreto en una muestra.

Tolerancia: Un estado de falta de respuesta a un antígeno específico o grupo de antígenos específicos a los que un sujeto (tal como un ser humano o animal) normalmente responde. La tolerancia inmunitaria se logra en condiciones que suprimen la reacción inmunitaria y no es solo la ausencia de una respuesta inmunitaria. La tolerancia inmunitaria puede ser el resultado de una serie de causas, incluido el contacto previo con el mismo antígeno en la vida fetal o en el período neonatal cuando el sistema inmunitario aún no está maduro; contacto previo con el antígeno a dosis extremadamente altas o bajas; exposición a radiación, medicamentos quimioterapéuticos u otros agentes que dañan el sistema inmunitario; enfermedades hereditarias del sistema inmunitario; y enfermedades adquiridas del sistema inmunitario.

Toxina: En el contexto de la presente divulgación, "toxina" se refiere a cualquier sustancia venenosa, incluyendo cualquier toxina química o toxina biológica.

Transgén: Una secuencia exógena de ácido nucleico introducida en una célula o el genoma de un organismo.

Trasplante o trasplantar: Se refiere al procedimiento de injerto de un órgano, tejido o células de un sujeto (por ejemplo, humano o animal) a otro sujeto o a otra región del mismo sujeto.

Uroquinasa: También llamada activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), la uroquinasa es una serina proteasa. La uroquinasa se aisló originalmente de la orina humana, pero está presente en varios lugares fisiológicos, tal como el torrente sanguíneo y la matriz extracelular. El sustrato fisiológico primario es el plasminógeno, que es una forma cimógeno inactiva de la serina proteasa plasmina. La activación de la plasmina desencadena una cascada proteolítica que, dependiendo del ambiente fisiológico, participa en la trombolisis o degradación de la matriz extracelular. En una realización de los procedimientos proporcionados en el presente documento, la uroquinasa se administra a una rata receptora antes de la inyección de hepatocitos. En algunas realizaciones, la uroquinasa es uroquinasa humana. En algunas realizaciones, la uroquinasa humana es la forma secretada de uroquinasa. En algunas realizaciones, la uroquinasa humana es una forma no secretada modificada de la uroquinasa (véase la patente de Estados Unidos n.º 5,980,886).

Vector: Una molécula de ácido nucleico que permite la inserción de ácido nucleico extraño sin alterar la capacidad del vector para replicarse y/o integrarse en una célula huésped. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula huésped, tales como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos. Un vector integrante es capaz de integrarse en un ácido nucleico del huésped. Un vector de expresión es un vector que contiene las secuencias reguladoras necesarias para permitir la transcripción y traducción de un gen o genes insertados.

A menos que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado entendido normalmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Los términos en singular "un", "uno/una", y "el" o "la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. De forma análoga, el término "y/o" cuando se usa en una lista de dos o más elementos, significa que se puede emplear uno cualquiera de los artículos enumerados por sí solo o se puede emplear cualquier combinación de dos o más de los artículos enumerados. Por ejemplo, si una composición comprende o excluye los componentes A, B y/o C, la composición puede contener o excluir A solo; B solo; C solo; A y B en combinación; A y C en combinación; B y C en combinación; o A, B y C en combinación. Además, debe entenderse que todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos y todos los valores de peso molecular o de masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados y se proporcionan con fines descriptivos. Aunque cualquiera de los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden utilizar en la práctica o en el ensayo de la presente divulgación, los procedimientos y materiales adecuados se describen a continuación. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

II. Resumen de diversas realizaciones y ejemplos

En el presente documento se describen ratas genéticamente modificadas (*Rattus sp.*), que tienen utilidad para diversos fines, incluyendo para la expansión de hepatocitos de otras especies (particularmente de ser humano) y como modelos animales de enfermedades hepáticas y patología hepática normal, incluyendo metabolismo intermedio, producción de ácido biliar, transportadores de molécula pequeña, evaluación de productos biológicos, metabolismo de fármacos, farmacocinética, así como cirrosis, carcinoma hepatocelular, infección hepática, toxicidad hepática, terapia génica, regeneración hepática, enfermedad del hígado alcohólico, enfermedad de hígado graso, enfermedad hepática metabólica y similares. El término "rata" tal como se usa en el presente documento, es específico del género *Rattus* y expresamente no abarca especies de ratones (*Mus sp.*).

Las ratas son deficientes en Fah y comprenden un genoma que es homocigótico para una interrupción en el gen *Fah*, de forma que la interrupción da como resultado la pérdida de expresión de la proteína FAH funcional, lo que da lugar a una disminución de la función hepática. No es necesario que la interrupción del gen *Fah* de como resultado una pérdida completa de expresión de la proteína FAH funcional. En algunos ejemplos, la pérdida o disminución de expresión, actividad o función, de la proteína FAH funcional es la pérdida de expresión de aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 % o aproximadamente el 99 % de proteína funcional. La

- interrupción del gen *Fah* puede ser cualquier modificación que de como resultado una disminución (reducción) significativa o pérdida completa de expresión de la proteína FAH funcional. En algunas realizaciones, la interrupción es una inserción, una delección o una o más mutaciones puntuales en el gen *Fah*, o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, la interrupción puede ser una inserción que incluye un codón de terminación en el marco. La inserción también puede incluir secuencias adicionales de ácido nucleico, tal como ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En ejemplos particulares, la rata deficiente en *Fah* es homocigótica para las interrupciones en el exón 3 del gen *Fah*. Además se desvelan células madre (ES) embrionarias de rata aisladas que comprenden una alteración en el gen *Fah*.
- En el presente documento también se desvela un procedimiento para producir una célula de rata deficiente en *Fah* (tal como una célula madre embrionaria) transfectando la célula de rata con un vector de direccionamiento AAV-DJ, en el que el vector de direccionamiento comprende un casete de direccionamiento que comprende brazos de homología en 5' y 3' que están dirigidos a una porción del gen *Fah* de rata (tal como el exón 3 del gen *Fah*) y que flanquean a una secuencia de ácido nucleico (tal como una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen de resistencia a antibióticos), tal que después de la transfección de la célula con el vector de direccionamiento, se produce una recombinación homóloga, reemplazando la porción objetivo del gen *Fah* de rata con el casete de direccionamiento, produciendo de este modo una célula de rata deficiente en *Fah*.
- En algunas realizaciones, se proporciona una rata inmunodeficiente. La inmunodeficiencia del ratón puede deberse a una alteración genética, inmunosupresión, o una combinación de los mismos. En una o más realizaciones, la rata carece de linfocitos T, linfocitos B y/ células NK funcionales.
- En algunas realizaciones, la rata está inmunodeprimida. En algunos ejemplos, la inmunodepresión es el resultado de la administración de uno o más agentes inmunosupresores. Se puede usar cualquier agente inmunosupresor adecuado o agentes efectivos para lograr la inmunosupresión en la rata. Los ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen, pero sin limitación, FK506, ciclosporina A, fludarabina, micofenolato, prednisona, rapamicina y azatioprina. También se pueden administrar combinaciones de agentes inmunosupresores.
- En otras realizaciones, la inmunodeficiencia es el resultado de una o más alteraciones genéticas que dan como resultado una falta de un componente específico del sistema inmunitario o la falta de funcionalidad de un componente específico del sistema inmunitario (tal como una falta de linfocitos B, T y/o células NK funcionales). linfocitos T y/o NK). En algunos ejemplos, la una o más alteraciones genéticas comprenden una alteración genética del gen *Rag2* o una alteración genética del gen *Il2rg*, de modo que la alteración genética da como resultado la pérdida de expresión de la proteína RAG-2 funcional o la proteína IL-2R γ . En un ejemplo, la una o más alteraciones genéticas comprenden una alteración genética del gen *Rag2* y una alteración genética del gen *Il2rg*. En algunos casos, la alteración genética comprende delecciones homocigóticas en el gen *Rag2* o el gen *Il2rg*. Tales delecciones, en combinación con la deficiencia de *Fah* dan como resultado una rata FRG KO. En otros ejemplos, la alteración genética es SCID, NOD o desnuda. Las células específicas del sistema inmunitario (tales como los macrófagos o las células NK) también pueden agotarse. Los procedimientos para la depleción de tipos de células concretas son conocidos en la técnica.
- En una o más realizaciones, la rata comprende hepatocitos heterólogos, tales como hepatocitos humanos. Se apreciará que una ventaja significativa de la invención es que los hepatocitos heterólogos no solo se han trasplantado/injertado en la rata, sino que se han expandido (es decir, proliferado de forma activa) en la rata. En otras palabras, diversas realizaciones de la invención se refieren a ratas que tienen hígados humanizados.
- También se proporcionan procedimientos para expandir hepatocitos heterólogos *in vivo*. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye trasplantar hepatocitos heterólogos en una rata deficiente en *Fah* que está inmunodeprimida o es inmunodeficiente y que permite la expansión de los hepatocitos heterólogos. Aún en otras realizaciones, el procedimiento incluye trasplantar hepatocitos heterólogos en una rata inmunodeficiente y deficiente en *Fah* y permitir que se expandan los hepatocitos heterólogos.
- En algunas realizaciones, los hepatocitos heterólogos se trasplantan mediante inyección en la arteria hepática, el bazo, la vena porta, la cavidad peritoneal, la masa de tejido hepático o el sistema linfático de la rata. En algunas realizaciones, los hepatocitos heterólogos trasplantados a la rata son hepatocitos humanos aislados. En algunas realizaciones, los hepatocitos heterólogos se trasplantan como parte de un injerto de tejido hepático. Los hepatocitos heterólogos aislados se pueden obtener de cualquiera de varios mamíferos diferentes, así como de diferentes fuentes. Los hepatocitos de mamífero se pueden obtener de perros, cerdos, caballos, conejos, ratones, tífes, marmotas, primates no humanos y seres humanos. En una realización, los hepatocitos heterólogos se aíslan del hígado de un donante de órganos humano o no humano. En otra realización, los hepatocitos heterólogos se aíslan de una resección quirúrgica. En otra realización, los hepatocitos heterólogos derivan de una célula madre, tal como una célula madre embrionaria, una célula madre de pluripotencia inducida, una célula madre derivada del mesénquima, una célula madre derivada de tejido adiposo, una célula progenitora adulta multipotencial, una célula madre somática no restringida o una célula madre hepática específica de tejido, que se puede encontrar en el hígado mismo, la vesícula biliar, el intestino, el páncreas o las glándulas salivales. En otra realización, los hepatocitos heterólogos derivan de monocitos o amniocitos, así, una célula madre o célula progenitora se obtiene *in vitro* para producir hepatocitos. En otra realización, los hepatocitos heterólogos se obtienen reprogramando un linaje celular distinto, tal como un fibroblasto de la piel, queratinocito o linfocito. En otra realización, los hepatocitos heterólogos han sido crioconservados antes de la

inyección (es decir, provienen de lotes crioconservados que se han descongelado). En algunas realizaciones, los hepatocitos humanos pueden aislarse de ratones humanizados, cerdos u otras ratas, como se trata con más detalle en el presente documento.

5 En algunas realizaciones, el uno o más agentes inmunosupresores (tratados anteriormente) se administran a la rata al menos aproximadamente 2 días antes del trasplante de hepatocitos heterólogos. La inmunosupresión puede continuar después del trasplante durante un período de tiempo, por ejemplo durante una parte o toda la vida de la rata.

10 Se apreciará que se pueden usar varios modelos de lesión hepática en la rata para facilitar el injerto y expansión de los hepatocitos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, lesión inducible y/o modificaciones genéticas (por ejemplo, interrupción de *Fah*, uPA, TK-NOG (Washburn y col., *Gastroenterology*, 140(4):1334-44, 2011), albúmina AFC8, albúmina toxina de la difteria, enfermedad de Wilson y similares). También se pueden usar combinaciones de técnicas de lesión hepática. En algunas realizaciones, se administra a la rata un vector que codifica un gen de uroquinasa antes de la inyección de los hepatocitos heterólogos. En una realización, el gen de la uroquinasa es uroquinasa humana. La uroquinasa de tipo salvaje es una proteína secretada. Por tanto, en algunas realizaciones, la uroquinasa humana es una forma secretada de uroquinasa (Nagai y col., *Gene* 36: 183-188, 1985). En algunas realizaciones, la uroquinasa humana es una forma no secretada modificada de la uroquinasa. Por ejemplo, Lieber y col., (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:6210-6214, 1995) describen formas no secretadas de uroquinasa generadas insertando una secuencia que codifica una señal de retención del retículo endoplásmico en el extremo carboxilo de la uroquinasa, o reemplazando el péptido señal pre-uPA péptido con la señal de retención de RR amino terminal (Strubin y col., *Cell* 47: 619-625, 1986; Schutze y col., *EMBO J.* 13: 1696-1705, 1994) y el anclaje transmembrana separado por un péptido espaciador de la proteína II de membrana lip33 (Strubin y col., *Cell* 47:619-625, 1986). Las formas no secretadas de uroquinasa también se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 5,980,886.

25 El vector que codifica la uroquinasa puede ser cualquier tipo de vector adecuado para la administración a la rata y capaz de expresar el gen de la uroquinasa. Tales vectores incluyen vectores virales o vectores plasmídicos. En una realización, el vector es un vector de adenovirus. En otra realización, el vector es un vector AAV. El vector que codifica la uroquinasa puede administrarse por cualquier medio adecuado conocido en la técnica. En una realización, el vector se administra por vía intravenosa. En un aspecto, el vector se administra mediante inyección retroorbital. El vector que codifica la uroquinasa puede administrarse en cualquier momento antes de la inyección de los hepatocitos heterólogos. Por lo general, el vector se administra para dar tiempo suficiente para que se exprese la uroquinasa. En una realización, el vector se administra de 24 a 48 horas antes de la inyección de hepatocitos.

30 El período de tiempo para la expansión de los hepatocitos puede variar y dependerá de diversos factores, incluyendo el número de hepatocitos trasplantados originalmente, la cantidad de hepatocitos heterólogos deseada después de la expansión y/o el grado deseado de repoblación hepática con los hepatocitos heterólogos. En algunos casos, estos factores serán dictados por el uso deseado de los hepatocitos o el uso deseado de la rata injertada con los hepatocitos heterólogos. En algunas realizaciones, los hepatocitos heterólogos se expanden en la rata durante al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 2 semanas o al menos aproximadamente 4 semanas, al menos aproximadamente 5 semanas, al menos aproximadamente 6 semanas, al menos aproximadamente 2 meses, al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 4 meses, al menos aproximadamente 5 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 7 meses, al menos aproximadamente 8 meses, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 10 meses o al menos aproximadamente 11 meses. En ejemplos particulares, los hepatocitos heterólogos se expanden en la rata durante al menos 7 días. En otros ejemplos, los hepatocitos heterólogos se expanden en la rata durante al menos 6 meses. En algunos ejemplos, los hepatocitos heterólogos se expanden en la rata no más de 12 meses.

45 En algunas realizaciones, a las ratas con deficiencia hepática se les puede administrar un agente que inhiba, retrase, evite o prevenga el desarrollo de enfermedad hepática en la rata. La administración de tal agente evita la disfunción hepática y/o la muerte de la rata antes de la repoblación de la rata con hepatocitos sanos (por ejemplo, que expresan FAH). El agente puede ser cualquier compuesto o composición conocida en la técnica que inhibe la enfermedad hepática. Uno de estos agentes es 2-(2-nitro-4-trifluoro-metil-benzoil)-1,3 ciclohexanodiona (NTBC), pero se pueden usar otros inhibidores farmacológicos de la fenilpiruvato dioxigenasa, tal como metil-NTBC. NTBC (u otro compuesto con un efecto protector del hígado) se administra para regular el desarrollo de enfermedad hepática en la rata con deficiencia de *Fah*. La dosis, pauta posológica y el procedimiento de administración se pueden ajustar según sea necesario para evitar la disfunción hepática en la rata con deficiencia de *Fah*. En algunas realizaciones, a la rata deficiente en *Fah* se administra además NTBC durante al menos dos días, al menos tres días, al menos cuatro días, al menos cinco días o al menos seis días después del trasplante de hepatocitos. En algunas realizaciones, a la rata deficiente en *Fah* se administra además NTBC durante al menos aproximadamente una semana, al menos aproximadamente dos semanas, al menos aproximadamente tres semanas, al menos aproximadamente cuatro semanas, al menos aproximadamente un mes, al menos aproximadamente dos meses, al menos aproximadamente tres meses, al menos aproximadamente cuatro meses, al menos aproximadamente cinco meses o al menos aproximadamente seis meses. En algunas realizaciones, el NTBC (u otro compuesto con un efecto protector del hígado) se retira aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días o aproximadamente siete días después del trasplante de hepatocitos.

La dosis de NTBC administrada a la rata con deficiencia de Fah puede variar. En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg al día, preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 10 mg/kg al día a aproximadamente 20 mg/kg al día e incluso más preferentemente aproximadamente 20 mg/kg al día. El NTBC puede administrarse por cualquier medio adecuado, tales como, pero sin limitación, en el agua potable, en la comida o por inyección. En una realización, la concentración de NTBC administrada en el agua potable es de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mg/l, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 mg/l, más preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 mg/l, e incluso más preferentemente de aproximadamente 20 mg/l.

En algunas realizaciones, el procedimiento incluye además recoger los hepatocitos heterólogos expandidos de la rata. Además se describe un hepatocito heterólogo expandido aislado del hígado de la rata.

Además, en el presente documento se proporciona un procedimiento de trasplante en serie de hepatocitos heterólogos (o hepatocitos de otra especie) en la rata receptora. El procedimiento comprende recoger los hepatocitos heterólogos expandidos de una primera rata receptora y expandir aún más los hepatocitos en una segunda, tercera, cuarta o más rata receptora. Los hepatocitos expandidos se pueden recolectar de la rata usando cualquiera de varias técnicas. Por ejemplo, los hepatocitos se pueden recolectar por digestión enzimática del hígado de rata, seguido de triturado suave, filtración y centrifugación. Además, los hepatocitos pueden separarse de otros tipos de células, tejido y/o desechos utilizando procedimientos bien conocidos, tal como mediante el uso de un anticuerpo que reconoce específicamente el tipo de célula de las especies de hepatocitos injertados. Dichos anticuerpos incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno mayor de histocompatibilidad de clase I, tal como HLA-A,B,C anti-humano (Markus y col., Cell Transplantation 6:455-462, 1997). Los hepatocitos unidos a los anticuerpos se pueden separar por *panning* (que utiliza un anticuerpo monoclonal unido a una matriz sólida), clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), separación de cuentas magnéticas o similares. Los procedimientos alternativos de recolección de hepatocitos son bien conocidos en la técnica.

Además se desvela un procedimiento para evaluar el efecto de un agente exógeno (xenobiótico) en los hepatocitos, tales como hepatocitos humanos, *in vivo*. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye administrar el agente exógeno a un modelo de rata descrito en el presente documento que se ha trasplantado con hepatocitos heterólogos y medir al menos un marcador de la función hepática en la rata. En algunas realizaciones, el al menos un marcador de la función hepática se selecciona de AST, ALT, bilirrubina, fosfatasa alcalina y albúmina, y en el que un aumento de la AST, ALT, bilirrubina o fosfatasa alcalina, o una disminución de la albúmina en la rata en relación con la rata antes de la administración del agente exógeno, indica que el agente exógeno es tóxico. En algunas realizaciones, el agente exógeno es una toxina conocida o posible.

III. Modelos animales y usos de los mismos

En el presente documento se describe un procedimiento para la generación de ratas con deficiencia de Fah mediante recombinación homóloga utilizando una construcción dirigida de AAV en células madre embrionarias de rata (ES). Los ejemplos describen la generación de una construcción dirigida de AAV que contiene un casete de resistencia a la neomicina y brazos de homología en 5' y 3' que dirigen la construcción para la inserción en el exón 3 del gen *Fah* de rata. Las células ES de rata se infectaron con el vector de direccionamiento AAV y se seleccionaron por su resistencia a neomicina para aislar clones celulares individuales con el vector integrado. Las células ES con deficiencia de FAH (KO) pueden inyectarse en blastocistos de rata y transferirse a ratas SD E 3.5p pseudopreñadas. La progenie de estas ratas se puede genotipar y las ratas quiméricas se pueden criar para generar machos y hembras heterocigóticos que se pueden criar para generar ratas homocigóticas FAH KO. La presente divulgación no se limita a un procedimiento concreto para generar una rata deficiente en Fah, sino que abarca cualquier procedimiento conocido en la técnica para producir una rata deficiente en Fah, incluyendo, aunque no de forma limitativa, TALEN, nucleasas de dedo de cinc, meganucleasas, SCNT y similares.

Las enzimas metabólicas adicionales en la ruta catabólica de la tirosina se pueden dirigir además de o en lugar de *Fah* para generar modelos animales con disfunción hepática grave ("deficiencia hepática"). Por ejemplo, genes que codifican la tirosina aminotransferasa, 4-hidroxi-fenilpiruvato dioxigenasa, homogentisato 1,2-dioxigenasa y/o maleilaetoacetato isomerasa pueden ser objeto de interrupción utilizando procedimientos similares a los descritos en el presente documento. En ausencia de tratamiento, las ratas deficientes (es decir, con expresión, actividad o función disminuidas) en una o más de las enzimas anteriores desarrollará una disfunción hepática, tal como tirosinemia (I, II, III), hawkinsinuria, alcaptonuria y similares, lo que finalmente da como resultado la muerte de los hepatocitos endógenos. Por tanto, como con los modelos deficientes en Fah, tales ratas también pueden repoblarse con hepatocitos de otras especies, incluidos los seres humanos.

También se desvela en el presente documento el injerto de hepatocitos heterólogos en hígados de ratas inmunodeficientes. En consecuencia, en el presente documento se contempla el uso de ratas inmunodeficientes (en ausencia de deficiencia de Fah) para la expansión de hepatocitos heterólogos. También se pueden usar ratas humanizadas (es decir, ratas que tienen hígados reconstituidos con hepatocitos humanos), por ejemplo, como fuente de hepatocitos para la reconstitución del hígado humano, así como para estudios de farmacología, toxicología y terapia génica, como se analiza a continuación.

En algunos casos, antes del trasplante con hepatocitos heterólogos, se inducirá daño hepático agudo en las ratas utilizando cualquier modelo adecuado de lesión hepática, incluyendo uPa, TK, embolia selectiva, isquemia transitoria, retrorsina, monocrotolina, irradiación con rayos gamma, tetracloruro de carbono y similares. En algunas realizaciones, el daño hepático se induce mediante la administración de un adenovirus recombinante que expresa la enzima similar a plasminógeno uroquinasa. Después de la administración de uroquinasa (tal como 24 horas después), los hepatocitos heterólogos pueden administrarse mediante inyección intraesplénica, donde los hepatocitos viajarán a través de la vasculatura para llegar al hígado. Además, los medicamentos de inmunodepresión pueden administrarse opcionalmente a las ratas antes, durante y después del trasplante para eliminar la respuesta del huésped frente al injerto en la rata de los hepatocitos heterólogos xenotransplantados. Al quitar a las ratas NTBC durante períodos de tiempo definidos, las células de rata se vuelven quiescentes y las células injertadas tendrán una ventaja proliferativa que conducirá al reemplazo de hepatocitos de rata endógenos con hepatocitos heterólogos. En el caso de los hepatocitos humanos, esto genera ratas con altos niveles de hígados humanizados. Los niveles de repoblación de hepatocitos heterólogos se pueden determinar mediante la cuantificación de los niveles de seroalbúmina humana correlacionados con la inmunohistoquímica de secciones de hígado de ratas trasplantadas.

15 A. Expansión de los hepatocitos y su uso médico

La presente divulgación contempla el uso de hepatocitos heterólogos expandidos y recogidos de una rata receptora como fuente de hepatocitos para la reconstitución hepática en un sujeto que necesita dicha terapia. La reconstitución del tejido hepático en un paciente mediante la introducción de hepatocitos es una opción terapéutica potencial para pacientes con insuficiencia hepática aguda, ya sea como tratamiento temporal en previsión de trasplante de hígado o como tratamiento definitivo para pacientes con deficiencias metabólicas aisladas (Bumgardner y col., Transplantation 65: 53-61, 1998). Se puede utilizar la reconstitución de hepatocitos, por ejemplo, para introducir hepatocitos modificados genéticamente para terapia génica o para reemplazar hepatocitos perdidos como resultado de una enfermedad, lesión física o química, o neoplasia maligna (patente de Estados Unidos Núm. 6,995,299). Por ejemplo, se ha informado del uso de hepatocitos transfectados en terapia génica de un paciente que padece hipercolesterolemia familiar (Grossman y col., Nat. Genet. 6: 335, 1994). Además, los hepatocitos humanos expandidos se pueden usar para poblar dispositivos artificiales de asistencia hepática. Los procedimientos concretos de trasplante y expansión de hepatocitos heterólogos en ratas, así como usos médicos de los hepatocitos heterólogos expandidos, se describen con mayor detalle a continuación.

1. Trasplante fetal preinmune de hepatocitos

Un procedimiento desvelado en el presente documento para expandir hepatocitos heterólogos en las ratas incluye el trasplante de hepatocitos heterólogos y/o progenitores de hepatocitos en fetos. En uno o más ejemplos, el procedimiento desvelado para el trasplante de hepatocitos preinmunes en ratas incluye la cría de ratas con deficiencia de Fah entre sí para generar solo descendencia homocigótica con deficiencia de Fah. Aproximadamente los días 9-15 de gestación (por ejemplo, el día 12), el feto de rata con deficiencia de Fah se externaliza quirúrgicamente y se inyecta con hepatocitos heterólogos a través de la vena umbilical o directamente en el hígado fetal. Este procedimiento también funcionaría con fetos de ratas inmunodeficientes genéticamente modificados o fetos de ratas que tienen otra deficiencia hepática.

El número de hepatocitos heterólogos inyectados en la rata puede variar y dependerá del uso deseado, la vía de administración y otros factores. En algunos ejemplos, se inyecta al feto de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 1×10^8 , tal como de aproximadamente 500.000 a aproximadamente 1×10^7 , hepatocitos heterólogos. En algunos ejemplos, en el feto se inyectan aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^8 , tal como aproximadamente 1×10^7 , hepatocitos heterólogos. En un ejemplo no limitante, se inyecta al feto aproximadamente 1×10^7 hepatocitos heterólogos directamente en el hígado fetal. En otros ejemplos, la cantidad de hepatocitos heterólogos inyectados es de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 500.000, tal como aproximadamente 300.000. Debido a la naturaleza inmadura del sistema inmunitario durante el desarrollo fetal, el feto desarrollará tolerancia inmunológica a los hepatocitos heterólogos. Por tanto, no es necesario tratar una rata que ha sido trasplantada con hepatocitos heterólogos durante el desarrollo fetal con agentes inmunosupresores.

En uno o más ejemplos, la rata preñada se mantiene con una cantidad efectiva de un inhibidor farmacológico de fenilpiruvato dioxigenasa, tal como NTBC u otro compuesto, para evitar la disfunción o insuficiencia hepática en el feto deficiente en Fah durante el embarazo. La dosis del inhibidor farmacológico de la fenilpiruvato dioxigenasa puede variar. Las dosificaciones de ejemplo se han analizado anteriormente. La dosis de NTBC puede modificarse según sea necesario para evitar la disfunción hepática en las ratas con deficiencia de Fah. Después del nacimiento, la rata deficiente en Fah injertada con hepatocitos heterólogos ya no se administrará NTBC para permitir la expansión de los hepatocitos heterólogos. En algunos ejemplos, a la rata con deficiencia de Fah ya no se administrará NTBC inmediatamente después del nacimiento. En otros ejemplos, la dosis de NTBC se reduce gradualmente con el tiempo, tal como durante aproximadamente de 1 a 6 días, tal como de 1 a 6 días desde la fecha de nacimiento.

2. Trasplante posnatal de hepatocitos

Un segundo procedimiento para expandir hepatocitos heterólogos en modelos de ratas descritos en el presente documento incluye el trasplante posnatal de los hepatocitos heterólogos y/o progenitores de hepatocitos en las ratas.

En algunos ejemplos, las ratas se trasplantan poco después del nacimiento, tal como en los 2 días o en una semana después del nacimiento. En otros ejemplos, se trasplantan ratas mayores, incluyendo ratas adultas. Los hepatocitos heterólogos generalmente se trasplantan a través de la arteria hepática, inyección intraesplénica o vena porta. En algunos ejemplos, las ratas deficientes en Fah se mantienen con un inhibidor farmacológico de fenilpiruvato dioxigenasa, tales como NTBC o metil-NTBC, para inhibir o evitar la disfunción hepática. Antes del trasplante de los hepatocitos heterólogos, las ratas pueden tratarse con uno o más agentes inmunosupresores para evitar el rechazo de los hepatocitos heterólogos. Por lo general, el uno o más agentes inmunosupresores se administran aproximadamente dos días antes del trasplante de hepatocitos heterólogos; sin embargo, el momento para iniciar el tratamiento con los agentes inmunosupresores puede variar si es necesario para lograr resultados óptimos. La administración de los agentes inmunosupresores típicamente continuará indefinidamente en una cantidad efectiva para evitar el rechazo de los hepatocitos heterólogos.

Una vez que se ha completado el trasplante de los hepatocitos heterólogos, a las ratas con deficiencia de Fah ya no se les administra NTBC para permitir la expansión de los hepatocitos heterólogos. La presencia de los hepatocitos heterólogos (que no son deficientes para Fah) permite que las ratas se mantengan sanas en ausencia de NTBC. En algunos casos, el tratamiento con NTBC se suspende inmediatamente después del trasplante de hepatocitos. En otros casos, el NTBC se reduce gradualmente con el tiempo, tal como más de aproximadamente uno a aproximadamente seis días. En algunos ejemplos, la dosis de NTBC, cuando se administra a las ratas con deficiencia de Fah, es de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 2,0 mg/kg al día. En algunos ejemplos, la dosis de NTBC es de aproximadamente 1,0 mg/kg al día. La dosis de NTBC puede modificarse según sea necesario para evitar la disfunción hepática en las ratas con deficiencia de Fah.

B. Fuentes de hepatocitos heterólogos

Se puede usar cualquier fuente adecuada de hepatocitos heterólogos o precursores/progenitores de hepatocitos en los procedimientos desvelados para el trasplante en ratas. Por ejemplo, los hepatocitos humanos pueden obtenerse de cadáveres donantes o resecciones hepáticas de varias especies de mamíferos o pueden obtenerse de fuentes comerciales. Los hepatocitos humanos también se pueden obtener de animales previamente injertados (es decir, animales humanizados cuyos hígados se han repoblado previamente con hepatocitos humanos, tales como los ratones FRG KO humanizados desvelados en los documentos WO 2008/151283 y WO 2010/127275). Los procedimientos para aislar hepatocitos humanos de tales animales se describen en el presente documento. Se anticipa que será posible trasplantar a ratas hepatocitos heterólogos de donantes de todas las edades o hepatocitos crioconservados. A menudo hay un retraso (generalmente de 1 a 2 días) entre el aislamiento de los hepatocitos humanos y el trasplante, lo que puede dar como resultado una viabilidad baja de los hepatocitos. Sin embargo, los sistemas de rata descritos en el presente documento pueden servir como medio para expandir los hepatocitos humanos incluso cuando el número de hepatocitos es limitado en número.

Los procedimientos para aislar hepatocitos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los procedimientos para aislar hepatocitos de donantes de órganos o resecciones hepáticas se describen en los documentos WO 2004/009766 y WO 2005/028640 y las patentes de Estados Unidos números 6,995,299 y 6,509,514. Los hepatocitos se pueden obtener de una biopsia hepática tomada por vía percutánea o mediante cirugía abdominal. Los hepatocitos heterólogos para trasplante en una rata receptora pueden aislarse de tejido hepático de mamífero mediante cualquier procedimiento conveniente conocido en la técnica. El tejido hepático se puede disociar mecánicamente o enzimáticamente para proporcionar una suspensión de células individuales, o se pueden usar fragmentos de tejido hepático intacto. Por ejemplo, los hepatocitos pueden aislarse de tejido donante mediante perfusión de colagenasa de rutina (Ryan y col., Meth. Cell Biol. 13:29, 1976) seguido de centrifugación a baja velocidad. Los hepatocitos pueden purificarse aún más filtrando a través de una malla de acero inoxidable, seguido de centrifugación en gradiente de densidad. Como alternativa, se pueden usar otros procedimientos para enriquecer los hepatocitos, tales como, por ejemplo, clasificación de células activada por fluorescencia, *panning*, separación de cuentas magnéticas, elutriación dentro de un campo centrífugo o cualquier otro procedimiento bien conocido en la técnica. Se pueden usar procedimientos de aislamiento de hepatocitos similares para recolectar hepatocitos heterólogos expandidos de un hígado de rata receptora.

Como alternativa, se pueden preparar hepatocitos heterólogos utilizando la técnica descrita por Guguen-Guillouzo y col., (Cell Biol. Int. Rep. 6:625 -628, 1982). Brevemente, se aísla un hígado o una porción del mismo y se introduce una cánula en la vena porta o una rama portal. A continuación se perfunde el tejido hepático, a través de la cánula, con un tampón libre de calcio, seguido de una solución enzimática que contiene colagenasa (tal como aproximadamente colagenasa al 0,025 %) en solución de cloruro de calcio (tal como cloruro de calcio a aproximadamente 0,075 %) en el tampón HEPES a un caudal de entre 30 y 70 mililitros por minuto a 37 °C. El tejido hepático perfundido se pica en trozos pequeños (tal como aproximadamente 1 milímetro cúbico). La digestión enzimática se continúa en el mismo tampón descrito anteriormente durante aproximadamente 10-20 minutos con agitación suave a 37 °C para producir una suspensión celular y los hepatocitos liberados se recogen filtrando la suspensión celular a través de una malla de nylon de 60-80 micrómetros. Los hepatocitos recogidos se pueden lavar en tampón HEPES frío a pH 7,0 usando centrifugación lenta para eliminar la colagenasa y los restos celulares. Las células no parenquimatosas se pueden eliminar mediante centrifugación en gradiente de metrizamida (véase la patente de Estados Unidos n.º 6,995,299).

Los hepatocitos pueden obtenerse a partir de tejido fresco (tal como tejido obtenido en las horas posteriores a la muerte) o tejido recién congelado (tal como tejido fresco congelado y mantenido a 0 °C o menos). Para algunas aplicaciones, se prefiere que el tejido heterólogo no tenga patógenos detectables, sea normal en cuanto a la morfología y la histología, y esencialmente libre de enfermedad. Los hepatocitos utilizados para el injerto pueden aislarse recientemente, tal como en un plazo de horas o se puede trasplantar después de períodos de tiempo más largos si las células se mantienen en medios de almacenamiento apropiados. Uno de estos medios es VIASPAN™ (una solución universal de enjuague aórtico y almacenamiento en frío para la conservación de los órganos intraabdominales; también conocida como solución de la Universidad de Wisconsin, o UW). Los hepatocitos también se pueden crioconservar antes del trasplante. Los procedimientos de crioconservación de hepatocitos son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 6,136,525.

Además de obtener hepatocitos heterólogos de donantes de órganos o resecciones hepáticas, las células usadas para el injerto pueden ser células madre de mamífero, tales como células madre humanas o células precursoras de hepatocitos que, tras el trasplante en la rata receptora, desarrollarse o diferenciarse en hepatocitos capaces de expansión. Las células humanas con propiedades de células ES se han aislado de la masa de células blastocistos internas (Thomson y col., *Science* 282:1145-1147, 1998) y células germinales en desarrollo (Shamblott y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13726-13731, 1998), y se han producido células madre embrionarias humanas (véase la patente de Estados Unidos n.º 6,200,806). Tal como se desvela en la patente de Estados Unidos n.º 6,200,806, las células ES se pueden producir a partir de primates humanos y no humanos. También se pueden obtener células madre pluripotenciales inducidas (iPS) inducidas a partir de células de primates humanos y no humanos (véase, por ejemplo, Yu y col., *Science* 318(5858):1917-1920, 2007; Takahashi y col., *Cell* 131(5):861-872, 2007; Liu y col., *Cell Stem Cell* 3(6):587-590, 2008). En general, las células ES de primate se aíslan en una capa confluyente de fibroblastos embrionarios murinos en presencia de medio celular ES. El medio celular ES generalmente consiste en 80 % de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; formulación rica en glucosa, sin piruvato, Gibco BRL), con suero bovino fetal al 20 % (FBS; Hyclone), β -mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma) y 1 % de reserva de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL). Las características distintivas de las células ES, en comparación con las células madre "multipotenciales" comprometidas presentes en adultos, incluyen la capacidad de las células ES para mantener un estado indiferenciado indefinidamente en cultivo y el potencial que las células ES tienen para desarrollarse en cada tipo de célula diferente. Las células ES (hES) humanas expresan SSEA-4, un antígeno de la superficie celular de glucolípidos reconocido por un anticuerpo monoclonal específico (véase, por ejemplo, Amit y col., *Devel. Biol.* 227:271-278, 2000). En uno o más ejemplos, los hepatocitos también pueden provenir de una fuente distinta de ESC.

Los hepatocitos humanos derivados de células madre mesenquimatosas humanas (hMSC) también se pueden usar en los procedimientos descritos en el presente documento. La exposición secuencial de hMSC derivadas de la médula ósea a factores hepatogénicos da como resultado la diferenciación de las células madre en células con propiedades de hepatocitos (véase Snykers y col., *BMC Dev Biol.* 7:24, 2007; Aurich y col., *Gut.* 56(3):405-15, 2007). También se ha descrito la diferenciación hepatogénica de las células madre mesenquimatosas derivadas de la médula ósea y las células madre derivadas de tejido adiposo (ADSC) (véase Talens-Visconti y col., *World J Gastroenterol.* 12(36):5834-45, 2006). Los hepatocitos humanos también pueden generarse a partir de monocitos. Ruhnke y col., (*Transplantation* 79(9):1097-103, 2005) describen la generación de células similares a los hepatocitos (NeoHep) a partir de monocitos de sangre periférica diferenciados terminalmente. Las células NeoHep se parecen a los hepatocitos humanos primarios con respecto a la morfología, la expresión de marcadores de hepatocitos, diversas funciones secretoras y metabólicas y actividades de detoxificación de fármacos. Además, en los procedimientos descritos en el presente documento también se pueden usar hepatocitos humanos derivados de amniocitos.

Los hepatocitos también pueden derivarse mediante la reprogramación de distintos tipos de células, tales como los fibroblastos de la piel (Huang y col., *Nature* 475 (73560): 386-389, 2011).

Existen líneas de células ES humanas y pueden usarse en los procedimientos desvelados en el presente documento. Las células ES humanas también pueden derivarse de embriones de preimplantación de embriones fertilizados *in vitro* (FIV). Los experimentos con embriones producidos por FIV humanos no utilizados están permitidos en muchos países, como Singapur y el Reino Unido, si los embriones tienen menos de 14 días. Solo los embriones de alta calidad son adecuados para el aislamiento de células ES. Se han descrito las condiciones de cultivo para cultivar el embrión humano de una célula al blastocisto expandido (véase, por ejemplo, Bongso y col., *Hum Reprod.* 4:706-713, 1989). El cocultivo de embriones humanos con células oviductales humanas da como resultado la producción de blastocistos de alta calidad. Los blastocistos humanos expandidos derivados de FIV cultivados en cocultivo celular o en medio definido mejorado, permite el aislamiento de células ES humanas (véase la patente de Estados Unidos n.º 6,200,806).

C. Recolección de hepatocitos heterólogos de ratas injertadas

Los hepatocitos expandidos se pueden recolectar de ratas receptoras usando cualquiera de una serie de técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, se pueda anestesiarse a las ratas y la vena porta o la vena cava inferior se canulan con un catéter. El hígado se puede perfundir con un tampón apropiado (al como un EBSS libre de calcio y magnesio suplementado con EGTA 0,5 mM y HEPES 10 mM), seguido de tratamiento con colagenasa (por ejemplo, usando una solución de EBSS con calcio y magnesio suplementado con 1 mg/ml de colagenasa II). El hígado digerido se extirpa de los animales, se pica para disociar los agregados celulares y generar una suspensión homogénea. Para enriquecer los hepatocitos, la suspensión celular se pasa a través de una malla de nylon (tal como secuencialmente a través de

una malla de nylon de 100 µm, 70 µm y 40 µm), seguido de centrifugación a baja velocidad y lavado de las células.

Los hepatocitos heterólogos recogidos de ratas receptoras pueden separarse de las células de rata u otros contaminantes (tal como tejido o restos celulares) utilizando cualquier técnica bien conocida en la materia. Por ejemplo, dichos procedimientos incluyen el uso de un anticuerpo que se une selectivamente a las especies de hepatocitos heterólogos. Para hepatocitos humanos, tales anticuerpos incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno mayor de histocompatibilidad de clase I, tal como HLA-A,B,C anti-humano (Markus y col., Cell Transplantation 6:455-462, 1997) o CD46. Los anticuerpos específicos para células humanas o hepatocitos humanos pueden usarse en diversas técnicas diferentes, incluyendo clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), *panning* o separación de cuentas magnéticas. Como alternativa, los anticuerpos que se unen selectivamente a las células de rata se pueden usar para eliminar las células animales contaminantes y enriquecer de este modo los hepatocitos humanos. La FACS emplea una pluralidad de canales de color, canales de detección por dispersión de luz de ángulo bajo y obtuso, y canales de impedancia, entre otros niveles de detección más sofisticados, para separar o clasificar células (véase la patente de Estados Unidos n.º 5, 061,620) unidas por el anticuerpo. La separación magnética implica el uso de partículas paramagnéticas que están: 1) conjugadas con los anticuerpos humanos específicos; 2) conjugadas con anticuerpos de detección que pueden unirse a los anticuerpos específicos de humanos; o 3) conjugadas con avidina que puede unirse a anticuerpos biotinilados. El *panning* implica un anticuerpo monoclonal unido a una matriz sólida, tal como cuentas de agarosa, cuentas de poliestireno, membranas de fibra hueca o placas de Petri de plástico. Las células que están unidas por el anticuerpo pueden aislarse de una muestra simplemente separando físicamente el soporte sólido de la muestra.

Los hepatocitos recogidos de ratas pueden ser, por ejemplo, crioconservados para su uso posterior, o sembrarse en cultivo de tejidos para envío y uso futuro.

D. Reconstitución hepática

Las ratas descritas en el presente documento proporcionan un sistema para propagar hepatocitos que puede usarse para reconstituir un hígado, como alternativa o complemento a un trasplante de hígado en un mamífero humano o no humano. En la actualidad, los pacientes que padecen enfermedad hepática pueden tener que esperar largos períodos de tiempo antes de que un órgano adecuado para trasplante esté disponible. Después del trasplante, los pacientes deben tratarse con agentes inmunosupresores durante toda su vida para evitar el rechazo del hígado del donante. Un procedimiento para propagar las células hepáticas sanas restantes del paciente podría proporcionar una fuente de tejido hepático funcional que no requeriría inmunosupresión para permanecer viable. En consecuencia, las ratas desveladas en el presente documento pueden usarse para reconstituir las células hepáticas de ser humano y mamíferos no humanos con enfermedad hepática y/o insuficiencia hepática usando sus propios hepatocitos, incluidos los producidos a partir de células madre específicas del paciente, que se han expandido en las ratas, o hepatocitos de un donante.

La reconstitución del tejido hepático en un paciente mediante la introducción de hepatocitos (también conocido como "trasplante de hepatocitos") es una opción terapéutica potencial para pacientes con insuficiencia hepática aguda, ya sea como tratamiento temporal en previsión de trasplante de hígado o como tratamiento definitivo para pacientes con deficiencias metabólicas aisladas (Bumgardner y col., Transplantation 65: 53-61, 1998). Un obstáculo importante para lograr la reconstitución terapéutica del hígado es el rechazo inmune de los hepatocitos trasplantados por parte del huésped, fenómeno denominado (cuando las células huésped y donante son genética y fenotípicamente diferentes) "rechazo de aloinjerto". Los agentes inmunosupresores han tenido un éxito parcial en la prevención del rechazo de aloinjertos (Javregui y col., Cell Transplantation 5: 353-367, 1996; Makowka y col., Transplantation 42: 537-541, 1986).

Los hepatocitos heterólogos expandidos en ratas también pueden usarse para aplicaciones de terapia génica. en el sentido de uso habitual, dichos hepatocitos se trasplantan a un huésped para corregir un defecto genético. No es necesario que los hepatocitos pasados deriven originalmente del mismo individuo o sujeto que será el receptor del trasplante pero pueden hacerlo.

Los hepatocitos heterólogos expandidos en ratas pueden usarse para reconstituir tejido hepático en un sujeto como preludeo o una alternativa al trasplante de hígado. Como un ejemplo no limitante, un sujeto que sufre de degeneración progresiva del hígado, por ejemplo, como resultado del alcoholismo, puede servir como donante de hepatocitos que luego se expanden en una rata. El número de hepatocitos se expande con respecto al número originalmente obtenido del sujeto y se trasplanta a la rata. Después de la expansión, los hepatocitos expandidos pueden aislarse de la rata y pueden usarse para reconstituir la función hepática del sujeto. Los hepatocitos en expansión en ratas pueden usarse no solo para aumentar el número de hepatocitos, pero también para eliminar selectivamente los hepatocitos afectados por enfermedades infecciosas o malignas. De manera específica, un sujeto puede sufrir hepatitis, donde algunos pero no todos los hepatocitos están infectados y los hepatocitos infectados pueden identificarse por la presencia de antígenos virales en o sobre la superficie celular. En dicho caso, se pueden recolectar hepatocitos del sujeto y se pueden seleccionar las células no infectadas para expandirse en una o más ratas, por ejemplo por FACS. Entre tanto, se podrían tomar etapas agresivas para eliminar la infección en el paciente. Después del tratamiento, el tejido hepático del sujeto puede ser reconstituido por hepatocitos expandidos en una o más ratas. Se podría utilizar un procedimiento análogo para pasar selectivamente células no malignas de un paciente que padece una neoplasia maligna del hígado, tal como CHC.

E. Modelos de HT1

La tirosinemia hereditaria DE tipo 1 (HT1) es una enfermedad metabólica autosómica recesiva grave que afecta al hígado y los riñones. La HT1 es el resultado de defectos en el gen *Fah*, ubicado en q23-q25 del cromosoma 15 en seres humanos y en el cromosoma 7 en ratones. Los pacientes con HT1 muestran diversos síntomas clínicos, tal como

- 5 daño hepático, desde la infancia, que avanza a cirrosis; factores de coagulación reducidos; hipoglucemia; concentraciones altas de metionina, fenilalanina y ácido aminolevulínico en plasma sérico; alto riesgo de carcinoma hepatocelular; y disfunción renal tubular y glomerular. En su forma severa, un patrón de daño hepático progresivo comienza desde la primera infancia. En su forma leve, el daño hepático crónico con una alta incidencia de hepatoma es característico.
- 10 Los animales homocigóticos para la interrupción del gen *Fah* tienen un fenotipo letal neonatal causado por disfunción hepática. Se ha demostrado previamente que el tratamiento con NTBC de ratones con deficiencia de *Fah* restaura la función hepática y elimina la letalidad neonatal (Grompe y col., *Nat Genet* 10: 453-460, 1995). La vida útil prolongada de estos animales dio como resultado un fenotipo análogo a HT1 en seres humanos, incluyendo el desarrollo de carcinoma hepatocelular y fibrosis. En consecuencia, las ratas deficientes en *Fah* desveladas en el presente
- 15 documento también representan modelos animales de la enfermedad humana HT1.

F. Modelo de enfermedad hepática

Como se ha analizado anteriormente, la deficiencia de *Fah* en ratas conduce a un fenotipo de enfermedad similar a la enfermedad humana HT1. Para evitar la letalidad, las ratas con deficiencia de *Fah* se mantienen en NTBC u otro compuesto que evite la disfunción hepática, sin embargo, la titulación de la dosis de NTBC puede usarse para

- 20 promover el desarrollo de fenotipos de tipo HT1, incluyendo CHC, fibrosis y cirrosis. En consecuencia, las ratas con diversas deficiencias hepáticas desveladas en el presente documento pueden usarse para estudiar diversas enfermedades hepáticas, incluyendo CHC y cirrosis.

En algunas realizaciones, las ratas con hígados humanizados se utilizan como modelos animales de enfermedad hepática humana. Las ratas pueden usarse como modelos de enfermedad hepática resultante de, por ejemplo, la

- 25 exposición a una toxina, enfermedad infecciosa o neoplasia maligna o un defecto genético (es decir, deficiencia de *Fah* que conduce a HT1). Los ejemplos de enfermedades hepáticas genéticas humanas para las cuales las ratas pueden servir como modelo incluyen, pero sin limitación, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperoxaluria, fenilcetonuria, enfermedad de orina de jarabe de arce, enfermedades de almacenamiento de glucógeno, enfermedades de almacenamiento lisosómico (tal como la enfermedad de Gaucher) y cualquier error innato del metabolismo. Los sistemas modelo desvelados pueden usarse para obtener una mejor comprensión de enfermedades hepáticas particulares e identificar agentes que pueden prevenir, retrasar o invertir los procedimientos de la enfermedad.

Cuando la rata se va a usar como modelo para la enfermedad hepática causada por una toxina, la rata deficiente en *Fah* se mantiene con una dosis de NTBC (o un fármaco que tiene un efecto protector del hígado similar al NTBC)

- 35 eficaz para inhibir la disfunción hepática o la insuficiencia hepática. La cantidad de agente tóxico requerida para producir resultados que imiten más estrechamente la afección humana correspondiente se puede determinar usando varias ratas expuestas a dosis crecientes del agente tóxico. Los ejemplos de agentes tóxicos incluyen, pero sin limitación, etanol, acetaminógeno, fenitoína, metildopa, isoniazida, tetracloruro de carbono, fósforo amarillo y faloidina. En algunos casos, las ratas, en ausencia de hepatocitos humanos, se usan como modelo para evaluar el efecto de
- 40 una toxina. En otros ejemplos, a la rata se trasplantan hepatocitos humanos para evaluar el efecto de la toxina en los hepatocitos humanos. En estos ejemplos, no es necesario mantener a la rata con deficiencia de *Fah* con una dosis de un fármaco protector del hígado tal como NTBC para preservar la función hepática. Por lo general, se permite que la expansión de los hepatocitos humanos proceda hasta el punto donde el tamaño de la población de hepatocitos humanos es sustancial (por ejemplo, se ha acercado al máximo), antes de que la rata se exponga al agente tóxico.

En realizaciones en las que se va a usar una rata como modelo para enfermedad hepática maligna (tal como CHC o hepatoma), a la rata con deficiencia de *Fah* se le administra una dosis lo suficientemente alta de un fármaco protector del hígado, tal como NTBC, para prevenir la muerte por disfunción hepática, pero lo suficientemente baja como para permitir el desarrollo de CHC u otras neoplasias hepáticas. Como alternativa, la rata con deficiencia de *Fah* puede mantenerse con una dosis del fármaco que preserva la función hepática y la neoplasia maligna puede producirse por

- 50 exposición a un agente transformador o por la introducción de células malignas. En algunos ejemplos, la rata, en ausencia de hepatocitos heterólogos, se usa como modelo para la enfermedad hepática maligna. En otros ejemplos, a la rata se trasplantan hepatocitos humanos para evaluar la enfermedad hepática maligna de las células humanas. En estos ejemplos, no es necesario mantener las ratas con deficiencia de *Fah* en el fármaco protector del hígado, tal como NTBC. El agente transformante o las células malignas pueden introducirse con la introducción de colonización
- 55 inicial de los hepatocitos humanos o después de que los hepatocitos humanos hayan comenzado a proliferar en la rata huésped. En el caso de un agente transformante, puede ser preferente administrar el agente en un momento en que los hepatocitos heterólogos están proliferando activamente. Los ejemplos de agentes transformantes incluyen aflatoxina, dimetilnitrosamina y una dieta deficiente en colina que contiene 0,05-0,1 % p/p de DL-etionina (Farber y Sarma, 1987, en *Concepts and Theories in Carcinogenesis*, Maskens y col., eds, Elsevier, Ámsterdam, pp. 185-220).
- 60 Dichos agentes transformantes pueden administrarse sistémicamente a la rata o localmente en el hígado mismo. Las

células malignas pueden inocularse directamente en el hígado.

G. Modelo para infecciones hepáticas

Los hepatocitos expandidos y recolectados de las ratas receptoras también se pueden usar para diversos estudios microbiológicos. Una serie de patógenos (por ejemplo, bacterias, virus y parásitos) solo se replicarán en un huésped humano o en hepatocitos humanos primarios. Por tanto, tener una fuente suficiente de hepatocitos humanos primarios es fundamental para los estudios de estos patógenos. Los hepatocitos humanos expandidos pueden usarse para estudios de infección viral y replicación o para estudios para identificar compuestos que modulan la infección por virus hepáticos. Los procedimientos para usar hepatocitos humanos primarios en estudios de virus hepáticos se describen en, por ejemplo, la patente europea n.º 1552740, la patente de Estados Unidos n.º 6,509,514 y la publicación PCT n.º WO 00/17338. Los ejemplos de virus hepáticos incluyen el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC) y el citomegalovirus (CMV). Los ejemplos de parásitos que infectan el hígado incluyen, por ejemplo, Los agentes causantes del paludismo (especies de *Plasmodium*, incluyendo *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* and *Plasmodium knowlesi*) y los agentes causantes de la leishmaniasis (especies de *Leishmania*, incluyendo *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. tropica*; *L. major*; *L. aethiopica*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) peruviana*).

Además de usar los hepatocitos humanos expandidos en ratas para estudios microbiológicos, las propias ratas pueden servir como modelos animales de infección por patógenos hepáticos. Por ejemplo, las ratas repobladas con hepatocitos humanos pueden infectarse con un patógeno hepático y usarse para detectar agentes candidatos para el tratamiento de la infección. Los agentes candidatos incluyen cualquier compuesto de una cualquiera de una serie de clases químicas, tales como pequeños compuestos orgánicos. Los agentes candidatos también incluyen biomoléculas, tales como, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico (incluidos oligonucleótidos antisentido, pequeños ARN de interferencia, microARN, ribozimas, ARN de horquilla corta, vectores de expresión y similares), péptidos y anticuerpos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

Los agentes candidatos se obtienen de una amplia variedad de fuentes, incluidas bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, existen numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Como alternativa, las bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles o se producen fácilmente. Además, las bibliotecas y compuestos producidos de forma natural o sintética se modifican fácilmente por medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales y pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden estar sujetos a modificaciones químicas directas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc. para producir análogos estructurales.

El uso de ratas para estudiar la infección por VHC y VHB, así como evaluar agentes candidatos para el tratamiento de estas infecciones, se trata más adelante. Sin embargo, los procedimientos se pueden aplicar a cualquier patógeno hepático de interés. En un ejemplo, una rata se usa para identificar agentes que inhiben la infección vírica, disminuir la replicación vírica y/o mejorar uno o más síntomas causados por la infección por VHB o VHC. En general, el agente candidato se administra a la rata y los efectos del agente candidato se evalúan en relación con un control. Por ejemplo, el agente candidato se puede administrar a un modelo de rata infectada con VHC y el título vírico de la rata tratada (por ejemplo, medido por RT-PCR de muestras de suero) se puede comparar con el título vírico de la rata antes del tratamiento y/o a una rata no tratada infectada con VHC. Una disminución detectable en el título vírico de una rata infectada después del tratamiento con un agente candidato es indicativo de la actividad antiviral del agente.

El agente candidato puede administrarse de cualquier manera adecuada apropiada para la administración del agente. Por ejemplo, el agente candidato puede administrarse por inyección (tal como por inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea o directamente en el tejido diana), por vía oral o por cualquier otro medio deseable. En algunos casos, el cribado *in vivo* incluirá una cantidad de ratas que recibirán cantidades y concentraciones variables del agente candidato (de ningún agente a una cantidad de agente que se acerque al límite superior de la cantidad que puede administrarse de manera segura al animal), y puede incluir la administración del agente en diferentes formulaciones y rutas. Los agentes candidatos pueden administrarse de forma individual o en combinaciones de dos o más, especialmente cuando la administración de una combinación de agentes puede dar como resultado un efecto sinérgico.

La actividad del agente candidato puede evaluarse usando una cualquiera de diversos medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando la rata está infectada con un patógeno hepatotrópico (por ejemplo, VHB o VHC), el efecto del agente se puede evaluar examinando las muestras de suero para detectar la presencia del patógeno (por ejemplo, midiendo el título viral) o los marcadores asociados con la presencia del patógeno (por ejemplo, una proteína específica del patógeno o un ácido nucleico codificador). Los procedimientos cualitativos y cuantitativos para detectar y evaluar la presencia y la gravedad de la infección vírica son bien conocidos en la técnica. En un ejemplo, la actividad de un agente contra la infección por VHB puede evaluarse examinando muestras de suero y/o secciones de tejido para detectar la presencia de un antígeno vírico (tal como el antígeno de superficie del VHB (HBsAg) o el antígeno del

núcleo del VHB (HbcAg)). En otro ejemplo, la actividad de un agente contra la infección vírica se puede evaluar examinando muestras de suero para detectar la presencia de ácido nucleico del virus (tal como el ARN del VHC). Por ejemplo, el ARN del VHC se puede detectar usando, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), ensayo competitivo de RT-PCR o ADN ramificado (ADNb), detección de ARN de cadena negativa (el intermediario replicativo del VHC) por RT-PCR, o secuenciación del ARN del virus para detectar mutación/cambio en el genoma del virus ("evolución de cuasiespecies") con terapia. Como alternativa o además, se puede realizar una biopsia del hígado del huésped y efectuar una hibridación de RT-PCR *in situ* para demostrar directamente cualquier alteración cualitativa o cuantitativa en la cantidad de partículas víricas dentro de las secciones de tejido. Como alternativa o además, se puede sacrificar al huésped y examinar el hígado histológicamente para detectar signos de infección y/o toxicidad causados por el agente.

Los modelos de rata descritos en el presente documento también pueden usarse para cribar vacunas candidatas por su capacidad para prevenir o mejorar la infección por un patógeno hepatotrópico. En general, una vacuna es un agente que, después de la administración, facilita al huésped el montaje de una respuesta inmunitaria contra el patógeno diana. La respuesta inmunitaria humoral, celular o humoral/celular provocada puede facilitar la inhibición de la infección por el patógeno contra el cual se desarrolla la vacuna. De particular interés en la presente divulgación son las vacunas que provocan una respuesta inmunitaria que inhibe la infección por y/o la replicación intrahepática de un patógeno hepatotrópico (por ejemplo, un patógeno microbiano, vírico o parasitario), particularmente un patógeno vírico, tales como VHB y/o VHC.

Para evaluar las vacunas candidatas, se transplanta a las ratas hepatocitos humanos para repoblar el hígado de la rata con hepatocitos humanos. El cribado de una vacuna eficaz es similar a los procedimientos de cribado descritos anteriormente. En algunos ejemplos, la vacuna candidata se administra a la rata antes de la inoculación del patógeno hepatotrópico. En algunos casos, la vacuna candidata se administra proporcionando un solo bolo (por ejemplo, inyección intraperitoneal o intramuscular, administración tópica o administración oral), que opcionalmente es seguido por una o más inmunizaciones de refuerzo. La inducción de una respuesta inmunitaria se puede evaluar examinando las respuestas de linfocitos B y T que son específicas para el antígeno/vacuna de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. A continuación, la rata inmunizada se expone al patógeno hepatotrópico. Por lo general, se expone a varias ratas inmunizadas con títulos crecientes del patógeno. A continuación, se observa a las ratas para determinar el desarrollo de infección y se evalúa la gravedad de la infección (por ejemplo, evaluando el título del patógeno presente o examinando los parámetros de la función del hepatocito humano). Los candidatos a vacunas que proporcionan una disminución significativa en la infección por el patógeno y/o una disminución significativa en la gravedad de la enfermedad resultado tras la exposición se identifican como vacunas viables.

H. Estudios de farmacología, toxicología y terapia génica

Los modelos de rata descritos y/o los hepatocitos heterólogos expandidos y recogidos de las ratas pueden usarse para evaluar las alteraciones en la expresión génica en dichos hepatocitos por cualquier compuesto farmacológico, tal como moléculas pequeñas, productos biológicos, toxinas ambientales o biológicas o sistemas de administración de genes.

Por ejemplo, los hepatocitos humanos expandidos y recolectados de ratas pueden usarse para evaluar la toxicidad de compuestos concretos en células humanas. Los procedimientos de ensayo de toxicidad de compuestos en hepatocitos aislados son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la publicación PCT n.º WO 2007/022419. De forma análoga, las ratas trasplantadas con hepatocitos humanos pueden usarse para evaluar la toxicidad de los agentes exógenos. En algunos ejemplos, el agente exógeno es una toxina conocida o posible.

En algunos ejemplos, las ratas trasplantadas con hepatocitos humanos (o hepatocitos humanos expandidos y recolectados de ratas) se usan para evaluar uno cualquiera de una serie de parámetros del metabolismo y la farmacocinética de los fármacos. Por ejemplo, se pueden realizar estudios para evaluar el metabolismo de los fármacos, las interacciones farmacológicas *in vivo*, la semivida del fármaco, las rutas de excreción/eliminación, los metabolitos en la orina, las heces, la bilis, la sangre u otro fluido corporal, inducción del citocromo p450, recirculación enterohepática e inducción enzimática/transportadora.

En algunos ejemplos, las ratas trasplantadas con hepatocitos heterólogos (o hepatocitos heterólogos expandidos y recolectados de ratas) se usan para evaluar la toxicología y la seguridad de un compuesto, incluidos agentes terapéuticos o agentes candidatos (tales como moléculas pequeñas o productos biológicos), toxinas ambientales o biológicas, o sistemas de administración de genes. Por ejemplo, se puede evaluar la proliferación del ciclo celular en hepatocitos humanos expandidos, tal como para determinar el riesgo de cáncer después de la exposición al compuesto. La toxicidad para los hepatocitos también se puede evaluar, tal como mediante histología, índice de apoptosis, pruebas de función hepática, análisis de la expresión génica, análisis del metabolismo y similares. El análisis del metabolismo de los hepatocitos también se puede realizar, tal como análisis de metabolitos después de la infección de precursores de isótopos estables.

La eficacia de fármacos concretos también se puede evaluar en ratas trasplantadas con hepatocitos humanos. Tales fármacos incluyen, por ejemplo, fármacos para tratar la hiperlipidemia/aterosclerosis, la hepatitis y el paludismo.

En algunos ejemplos, las ratas trasplantadas con hepatocitos humanos (o hepatocitos humanos expandidos y recolectados de ratas) se usan para estudiar protocolos y vectores de terapia génica. Por ejemplo, se pueden evaluar los siguientes parámetros: eficiencia de transducción de vehículos de administración de genes, incluidos vectores virales y no virales; frecuencia de integración y ubicación de cargas genéticas (análisis del sitio de integración); funcionalidad de cargas genéticas (niveles de expresión génica, eficiencia de eliminación de genes); y los efectos secundarios de las cargas genéticas (análisis de expresión génica o proteómica en hepatocitos humanos *in vivo*).

IV. Vectores que codifican la uroquinasa

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento, a las ratas se les administra un vector que codifica uroquinasa antes del trasplante de los hepatocitos heterólogos. La expresión ectópica de uroquinasa induce la muerte hepatocelular y, posteriormente, estimula la regeneración hepática y, por lo tanto, puede ayudar en la eficacia del injerto de hepatocitos (Lieber y col., Proc Natl Acad Sci USA 92: 6210-6214, 1995).

En una realización, la uroquinasa (también conocida como activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA)) es la forma secretada de uroquinasa humana. En otra realización, la uroquinasa es una forma no secretada modificada de la uroquinasa (véase la patente de Estados Unidos n.º 5,980,886). Se contempla cualquier tipo de vector adecuado para la expresión de uroquinasa en animales. Tales vectores incluyen vectores plasmídicos o vectores víricos. Los vectores adecuados incluyen, pero sin limitación, vectores de ADN, vectores de adenovirus, vectores retrovirales, vectores retrovirales seudotipados, vectores AAV, vector de leucemia de mono gibón, VSV-G, vectores VL30, vectores mediados por liposomas, y similares. En una realización, el vector viral es un vector de adenovirus. El vector de adenovirus puede derivarse de cualquier adenovirus adecuado, incluyendo cualquier serotipo de adenovirus (tal como, pero sin limitación, Ad2 y Ad5). Los vectores de adenovirus pueden ser vectores adenovirales de primera, segunda, tercera y/o cuarta generación o vectores adenovirales no intestinales. Los vectores no virales pueden estar constituidos por plásmidos, fosfolípidos o liposomas (catiónicos y aniónicos) de diferentes estructuras. En otra realización, el vector viral es un vector AAV. El vector AAV puede ser cualquier vector AAV adecuado conocido en la técnica.

Los vectores virales y no virales que codifican la uroquinasa son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un vector de adenovirus que codifica uroquinasa humana se describe en la patente de Estados Unidos N.º 5,980,886 y de Lieber y col., (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(13):6210-4, 1995). La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2005-176129 y la patente de Estados Unidos n.º 5,585,362 describen vectores de adenovirus recombinantes y la patente de Estados Unidos n.º 6,025,195 desvela un vector adenovirus para expresión específica del hígado. La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0166284 describe vectores de virus adenoasociados (AAV) para la expresión específica del hígado de un gen de interés, incluyendo uroquinasa. Las patentes de Estados Unidos n.º 6,521,225 y 5,589,377 describen vectores AAV recombinantes. La publicación PCT n.º WO 0244393 describe vectores virales y no virales que comprenden el gen activador del plasminógeno de uroquinasa humana. Un vector de expresión capaz de un alto nivel de expresión del gen de la uroquinasa humana se desvela en la publicación PCT n.º WO 03087393.

Los vectores que codifican uroquinasa pueden incluir opcionalmente secuencias de control de la expresión, incluyendo promotores apropiados, potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de iniciación (es decir, ATG) frente a un gen que codifica la proteína, señal de corte y empalme para intrones y mantenimiento del marco de lectura correcto de ese gen para permitir la traducción adecuada del ARNm y codones de terminación. Generalmente, las secuencias de control de la expresión incluyen un promotor, una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción.

El vector de expresión puede contener un origen de replicación, un promotor, así como genes específicos que permiten la selección fenotípica de las células transformadas (tal como un casete de resistencia a antibióticos). En general, el vector de expresión incluirá un promotor. El promotor puede ser inducible o constitutivo. El promotor puede ser específico de tejido. Los promotores adecuados incluyen el promotor de timidina quinasa (TK), metalotioneína I, poliedro, enolasa específica de neuronas, tirosina hidroxilasa, beta-actina u otros promotores. En una realización, el promotor es un promotor heterólogo.

En un ejemplo, la secuencia que codifica la uroquinasa se encuentra corriente abajo del promotor deseado. Opcionalmente, también se incluye un elemento potenciador y generalmente se puede ubicar en cualquier parte del vector y aún así tener un efecto potenciador. Sin embargo, la cantidad de actividad aumentada generalmente disminuirá con la distancia.

El vector que codifica la uroquinasa puede administrarse por diversas vías, incluyendo, pero sin limitación, intravenosa, intraperitoneal o por infusión intravascular a través de la vena porta. La cantidad de vector administrado varía y puede determinarse usando experimentación de rutina. En una realización, a las ratas se les administra un vector de adenovirus que codifica la uroquinasa a una dosis de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{10} unidades formadoras de placas, tal como aproximadamente 5×10^9 unidades formadoras de placas.

En una realización, a la rata se le administra un vector de adenovirus que codifica la uroquinasa humana. Los vectores de adenovirus tienen varias ventajas sobre otros tipos de vectores virales, tales como pueden generarse a títulos muy altos de partículas infecciosas; infectan una gran variedad de células; transfieren eficientemente genes a células que

bajo la selección se amplificaron adicionalmente y se aisló el ADN genómico. Los clones de células ES de los 95 clones seleccionados de G418 se integraron en el locus correcto del genoma de rata como se determina mediante PCR usando cebadores específicos de FAH para el extremo 5' o el extremo 3' del sitio de integración. Diez clones de ES se validaron adicionalmente mediante análisis de transferencia Southern para confirmar la integración genómica correcta del casete de FAH KO (Figura 3). Primero, los clones de ES se descongelaron y expandieron en pocillos duplicados de una placa de 24 pocillos. Se cosechó un pocillo por cada clon, se precipitaron y se congelaron en nitrógeno líquido, y después se almacenaron a -80 °C hasta que esté listo para usar. El ADN genómico se aisló de la muestra lisando el sedimento celular con SDS, digiriendo la proteína y precipitando el ADN genómico (ADNg) con cloruro de sodio saturado e isopropanol. Aproximadamente 20 µg de ADNg de cada clon se digirieron con la endonucleasa de restricción Bgl II, y las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,7 %:trisborato-EDTA durante 6 horas a 45 voltios. El ADN se expuso a la depuración ácida antes de la transferencia capilar con tampón de transferencia alcalina. Los clones de FRG KO recombinados se identificaron por hibridación de la membrana de nylon usando una sonda marcada con ³²P que se mapeó inmediatamente al extremo 3' del casete de FRG KO: PGK-Neomicina. La figura 4 es un esquema del gen rFah con el casete de direccionamiento integrado. Los clones recombinantes defectivos se identificaron mediante un fragmento único de 7,9 Kb. Los resultados se muestran en las figuras 5-6.

La figura 5 (a) confirma la integración por recombinación homóloga. Mediante el uso de los cebadores 5' FAH + NEO (inverso) y 3' FAH + NEO (directo), se confirmó que ambos flancos estaban intactos como se predijo para la integración en el exón 3 por recombinación homóloga. La figura 5 (b) es el gel de control que confirma la presencia de ADN en las muestras. La figura 6 muestra un esquema del gen salvaje de rFah y el genoma KO de la región objetivo, junto con la transferencia Southern usando una sonda Fah. Tanto los alelos no objetivo como los objetivo se visualizan y tienen los tamaños de banda esperados. Esto confirma la selección adecuada del locus *Fah* de rata en los clones 11, 15 y 18.

Las células ES con deficiencia de FAH objetivo pueden usarse para generar una rata Fah KO usando procedimientos notificados por Tong y col., (Nature 467(7312):211-213, 2010).

Ejemplo 2

Generación de ratas FAH KO y trasplante de hepatocitos humanos

Las ratas FAH KO se generaron inyectando células ES FAH KO en blastocistos de rata, que después se transfieren a ratas SD E3.5 pseudo gestantes. La progenie quimérica de estas ratas se cría para generar ratas FAH KO heterocigóticas por transmisión de línea germinal. Los heterocigóticos machos y hembras se crían adicionalmente para generar ratas con eficiencia de FAH. La delección del gen FAH permite la inducción de daño hepático para ayudar en los altos niveles de injerto y repoblación del hígado con hepatocitos humanos trasplantados.

Antes del trasplante con hepatocitos animales humanos, en las ratas se induce daño hepático agudo mediante administración del adenovirus recombinante que expresa la enzima uroquinasa similar a plasminógeno. Veinticuatro horas después, los hepatocitos humanos se administran mediante inyección intraesplénica, donde los hepatocitos viajarán a través de la vasculatura para llegar al hígado. Además, los fármacos de inmunodepresión se administran opcionalmente a las ratas antes, durante y después del trasplante para eliminar la respuesta del huésped frente al injerto en la rata de los hepatocitos humanos xenoinjertados. Al quitar a las ratas NTBC durante períodos de tiempo definidos, las ratas se hacen quiescentes y las células humanas tienen una ventaja proliferativa, que conduce a la sustitución de hepatocitos de rata con hepatocitos humanos y la generación de ratas con niveles altos de quimerismo humano en el hígado. Los niveles de repoblación de hepatocitos humanos se determinan mediante la cuantificación de los niveles de seroalbúmina humana y otros marcadores específicos humanos y se correlacionan con la inmunohistoquímica de secciones de hígado de ratas trasplantadas.

Ejemplo 3

Generación de la construcción Il2rg

La construcción Il2rg de rata tiene como objetivo el exón 3 del gen Il2rg. Se usó ADN genómico de células ES de rata para generar regiones de homología con Il2rg en 5' y 3' para la construcción de direccionamiento. Se generó una región de homología con Il2rg en 5' usando un cebador directo de 1,46 kb corriente arriba del exón 3 (Tabla 2) y un cebador inverso que contiene un codón de terminación que termina 40 pb dentro del exón 3 del gen IL2rg. Se generó una región de homología con Il2rg en 3' usando un cebador directo que contiene 40 pb en el exón 3 y termina en el exón 6 (1,5 kb; Tabla 2). Los dos productos de PCR de 1,5 kb se clonaron, se secuenciaron y se ligaron a un casete de selección PGK: NEO sumando un total de 4,7 kb, similar al de la construcción de FAH descrita en el ejemplo 1. La construcción se secuenció y usó para la producción viral.

Tabla 2. Cebadores usados en el diseño de la construcción rIL2rg

Localización del cebador	Secuencia del cebador 5' a 3'	SEQ ID NO:
5'Rata IL2rg DIR	gtagcgaattcgcggccgctgattggattctcgggtgga	17
5rata IL2rg INV	ggatagaattcgtcagtggtgctgactcctggaatgtattatt	18
3' Rata IL2rg DIR	gtagca agcttaggcgagccgaacagaagctaaac	19
3' Rata IL2rg INV	ggataggtaccgcggccgcCAGGGATAAGCACAGCTTC	20

Ejemplo 4

Perfusión y aislamiento de hepatocitos de un ratón humanizado

5 En este Ejemplo, se aislaron hepatocitos humanos de un ratón genéticamente modificado (el ratón FRG KO) repoblado con hepatocitos humanos. Los hepatocitos humanos aislados del ratón se usaron en los estudios descritos en el Ejemplo 5.

10 Los hepatocitos se aislaron de un hígado *in situ* de un ratón altamente repoblado (modelo de ratón con deficiencia de FRG, Yecuris Corporation; véanse los documentos WO 2008/151283 y WO 2010/127275): niveles de albúmina= 4,37 mg/ml, Estado de NTBC: 0 mg/l) usando un procedimiento de perfusión de colagenasa. El ratón se anestesió primero y luego se inmovilizó sobre una superficie absorbente de humedad. Se abrió el abdomen y se insertó una cánula en la vena porta. A continuación, se perfundió el hígado con EBSS sin calcio ni magnesio, Hepes 10 mM pH 7,4 y EDTA 0,5 mM para blanquear el hígado y eliminar la coagulación sanguínea. A continuación, el hígado se perfundió usando una solución de colagenasa de tipo II de 1 mg/ml en EBSS con calcio y magnesio y Hepes 10 mM pH 7,4 durante 8 minutos hasta que el hígado se digirió completamente. Luego se extrajo el hígado a una placa de Petri y se disoció con fórceps y tijeras para obtener una suspensión homogénea. A continuación, se usaron 5 ml de medio de perfusión (DMEM + suero bovino fetal al 10 %) para desactivar la colagenasa.

20 Usando una pipeta estéril de 25 ml, la suspensión de hígado se pasó a través de un filtro de 100 micrómetros a un tubo de 50 ml. La placa de Petri se lavó luego con medio de perfusión, pasándolo a través del filtro al tubo de 50 ml. El volumen en el tubo se ajustó a 45 ml con medio de perfusión, y se invirtió dos o tres veces para asegurar una solución homogénea. A continuación, se pasó la suspensión celular a través de un filtro de 70 micrómetros a un tubo nuevo de 50 ml. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 140 x g y 4 °C. El sobrenadante se aspiró cuidadosamente y el sedimento celular se resuspendió en 10 ml de medio de perfusión. Para disociar cualquier agregado celular, la suspensión celular se pasó a través de la pipeta de 10 ml durante un total de cinco veces. El volumen de la suspensión se ajustó a 45 ml con medio de perfusión. Las células se sedimentaron por centrifugación durante 5 minutos a 140 x g y 4 °C. Esto se considera el primer lavado del sedimento celular. Esta etapa se repite una vez más. Después de la última centrifugación, las células se resuspendieron en 10 ml de medio de perfusión, se pasaron a través de la pipeta cinco veces y el volumen se ajustó a 45 ml con medio de perfusión. La suspensión celular se diluyó luego a 1:2 en medio de perfusión y se contó con azul tripán en una cámara de hemocitómetro. Los resultados se enumeran a continuación:

Ratón	Viable	Inviable	Total	% Viable	# Viable de células/ml	Células viables totales
1338	297	19	316	94	3 x 10 ⁶	135 x 10 ⁶

30 Las células (2,25x10⁶) utilizadas para el análisis de FAC se transfirieron a un tubo estéril de 15 ml y el volumen se ajustó a 10 ml con medio de perfusión.

Ratón	Volumen (ml)
1338	0,75

Se eliminaron los siguientes números de células para trasplante a ratas:

N.º de células/ratón	N.º total de ratones	M, totales	N.º total de células
1,00x10 ⁶	15	3 ml	15,00 x10 ⁶
3,00x10 ⁶	17	17 ml	51,00 x10 ⁶

Los volúmenes se igualaron entre los dos tubos. Las células se sedimentaron a 140 xg durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se aspiró y los gránulos se resuspendieron en el volumen indicado de medio especificado:

Fin	Solución 1	Volumen	Número total de células
FAC	Medio de perfusión	850 µl	2,25 x10 ⁶
1,00x10 ⁶ células/ratón	HCM (Lonza, n.º cat. C3198)	3,375 ml + 375 µl de Anakin	15,00 x10 ⁶
3,00x10 ⁶ células/ratón	HCM (Lonza, n.º cat. C3198)	3,825 ml + 425 µl de Anakin	51,00 x10 ⁶

Análisis FACS para determinar el % de hepatocitos humanos:

Se dispensaron 4 X 200 µl de la suspensión celular que se utilizará para el análisis de FAC en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml (cada tubo contenía ~ 400.000 células). Los siguientes anticuerpos primarios se añadieron a cada tubo: n.º 1 = nada, control negativo; n.º 2 = 2 µl de HLA ABC; n.º 3 = 2 µl de OC2-2F8 y 2 µl de OC2-2G9; y n.º 4 = 2 µl de HLA ABC, 2 µl de OC2-2F8 y 2 µl de OC2-2G9.

La solución se mezcló moviendo los tubos, seguido de incubar en hielo durante 30-60 minutos, moviendo cada 5-10 minutos para mantener las células suspendidas. El anticuerpo primario se lavó añadiendo 1 ml de medio de perfusión a cada tubo y se mezcló por inversión varias veces. Las células se sedimentaron por centrifugación a 100 x g durante 3 minutos a 4 °C. El sobrenadante se aspiró, seguido de resuspender cada sedimento celular en 200 µl de una solución de anticuerpo secundario que consiste en: 850 µl de medio de perfusión; 8,5 µl de estrept-APC; y 8,5 µl de PE anti-rata. La solución se mezcló moviendo los tubos, seguido de incubar en hielo durante 30-60 minutos, moviendo cada 5-10 minutos para mantener las células suspendidas.

El anticuerpo secundario se lavó añadiendo 1 ml de medio de perfusión a cada tubo, seguido de mezclar mediante inversión. Los tubos se centrifugaron a 100 x g durante 3 minutos a 4 °C, para sedimentar las células, seguido de aspirar el sobrenadante y resuspender cada sedimento celular en 200 µl de solución de PI: 5 µl de PI; 4 µl de EDTA 0,5 M; y 1 ml de medio de perfusión. El análisis de FAC determinó que el porcentaje de repoblación por hepatocitos humanos en el hígado de ratón fue del 91 %.

Ejemplo 5

Injerto de hepatocitos humanos en ratas inmunodeficientes

La humanización del hígado no se ha intentado con éxito en ratas sin el uso de hepatectomía parcial. En este ejemplo, las ratas desnudas (RNU) se repoblaron con hepatocitos humanos inyectando Ad: uPa trasplantado con hepatocitos humanos que contenían Anakinra y se trataron con FK506, sin una hepatectomía parcial.

Cuarenta cachorros de ratas desnudas (2 semanas de edad) se obtuvieron de Charles River y se aclimataron durante una semana antes de que comenzara el estudio. Las ratas se asignaron a grupos + o - inmunosupresores, con controles en cada grupo (véase la Tabla 3 a continuación). Las ratas asignadas al grupo +inmunosupresor fueron tratadas con dosis subcutáneas de 2 mg/kg/día de FK506 (Tacrolimus) durante todo el estudio, con una dosis inicial de 20 µl de FK506 5 mg/ml (inyección i.p.) al día, en función del peso inicial promedio del animal de 50 g al comienzo del estudio. Las ratas inmunosupresoras no fueron tratadas con FK506, pero se les inyectó por vía subcutánea el mismo volumen de solución salina durante todo el estudio. Todas las ratas recibieron una inyección intravenosa (retroorbital) de adenovirus uPA (2,5 x 10⁹ unidades formadoras de placa (UFP) por 50 g de rata) 48-96 horas antes de la inyección de hepatocitos.

Veintiún días después de la administración de la primera dosis de FK506, a las ratas se les inyectó intraesplénicamente con placebo (PBS) o suspensiones celulares de hepatocitos humanos con Anakinra, de acuerdo con la Tabla 3 a continuación, seguido de la administración postoperatoria de la reserva de Buprenex a 1 µg/ml (5 µl/g) y Cetiofur a 1,25 mg/ml (200 µl). Los hepatocitos humanos se perfundieron a partir de hígados de ratón humanizados como se explica en el Ejemplo 4.

Tabla 3. Animales y células

Condiciones	Número total de células	Ratas + Inmunosupresión	Ratas - Inmunosupresión
Control (0,2 ml de PBS)	0	3	3
5x10 ⁶ células/ml (0,2 ml)	1x10 ⁶	8	6
10x10 ⁶ células/ml (0,3 ml)	3x10 ⁶	8	7
Ratas totales		19	16
Células totales necesarias		32x10 ⁶	27x10 ⁶

Veinticuatro horas después de la inyección de hepatocitos, se inyectó a todas las ratas Anakinra (10 µl/2510 µl/25 g), Buprenex (5 µl/g) y Cetiofur a 1,25 mg/ml (200 µl), y luego nuevamente a las 48 horas después de la operación. Tres días después de la cirugía, se recogieron 2 µl de sangre (sangrado de vena safena) de cada rata. La sangre se diluyó en 1 ml de diluyente para muestras de tampón de ELISA. A continuación, se probaron las muestras para seroalbúmina humana (hSA) mediante ELISA cuantitativo de albúmina humana. Este procedimiento se repitió semanalmente durante

todo el estudio. El análisis del primer ELISA mostró que la lectura de densidad óptica promedio (450 nm) de las muestras experimentales era el doble que la de los controles inyectados con PBS. Tanto el -FK506 inyectado con 1×10^6 células como el + FK-506 inyectado con 3×10^6 células tuvieron las lecturas de densidad óptica más altas a 0,027. Aunque el intervalo de los niveles de albúmina humana cayó por debajo del rango lineal de la curva estándar de ELISA, las muestras todavía exhibían lecturas de densidad óptica detectables para la albúmina humana.

Dos semanas después del comienzo del estudio, la dosis de FK506 se incrementó a 30 μ l de 5 mg/ml debido a un aumento en el peso del animal. Cuatro semanas después del comienzo del estudio, la dosis de FK506 se aumentó nuevamente a 25 μ l de 10 mg/ml para dar cuenta del crecimiento de las ratas.

Cuatro semanas después de la inyección de hepatocitos (~ 5 semanas después del comienzo del estudio), se recogieron al menos 50 μ l de sangre completa de las ratas y se dejaron coagular durante 1 hora a temperatura ambiente. Se recogió el suero mediante centrifugación de la sangre completa a 1.500 rpm x 15 minutos. A continuación, el suero se diluyó 1:25 y 1:50 y se usó para la prueba de hSA mediante ELISA. También se tomaron cinco μ l de sangre completa de 6 ratas aleatorias en el grupo de tratamiento + FK506. Cinco animales dieron positivo para la albúmina humana entre los rangos de 12 y 70 ng/ml con suero. Una muestra de sangre completa (n.º 33) dio positivo a la albúmina humana a 220 ng/ml. Las ratas también se volvieron a pesar y se descubrió que las ratas inmunodeprimidas + eran significativamente más pequeñas que sus homólogos no tratados, por lo tanto, la administración de FK506 se cambió a cada dos días.

Ocho semanas después de la inyección de hepatocitos, se tomaron 5 μ l de sangre completa de cada animal para ELISA. La sangre se diluyó inmediatamente en 1 ml de tampón de muestra para una dilución de 1:200. La rata n.º 29 (3×10^6 ; grupo +FK506) dio positivo para hSA en todas las réplicas. Los resultados se confirmaron mediante una repetición ciega independiente.

Casi nueve semanas después de la inyección de hepatocitos, se sacrificó a todos los animales. Se realizaron punciones y desangramientos cardíacos para obtener sangre completa y suero para ELISA. El primer lugar, se administró a los animales 500 μ l de un cóctel de ketamina antes de la punción cardíaca. Las porciones del bazo y el hígado (lóbulo 6) se congelaron rápidamente para el aislamiento del ADN genómico y la detección de genes humanos. Las porciones restantes de hígado y bazo se fijaron en formol tamponado normal al 10% durante 48 horas, en ese momento se restirieron a etanol al 70 % antes de la inclusión en parafina. Las secciones de hígado se tiñeron con anticuerpo FAH para identificar los hepatocitos humanos. Como control se usó un hígado de ratón FRG KO humanizado. Los tejidos se analizaron para evaluación histológica y tinción. Los resultados se muestran en la figura 7. Las secciones se generaron a partir de un control de hígado y bazo, así como el hígado y el bazo de la rata n.º 29. Las imágenes muestran que el hígado de la rata n.º 29 contenía hepatocitos humanos positivos mediante tinción con anticuerpo FAH humano específico. Estas secciones son similares al injerto observado en el modelo de ratón FAH confirmado con el mismo anticuerpo.

Los datos iniciales de ELISA demostraron la presencia de albúmina de suero humano en las ratas desnudas injertadas. Los datos obtenidos de análisis ELISA posteriores, así como el IHC positivo indica que una población de células humanas pudo injertarse en ratas desnudas tratadas con uPA, anakinra y FK506. Los niveles de albúmina humana (~ 1,5 μ g/ml) se refieren a 10.000 hepatocitos en el hígado que son hepatocitos humanos.

Ejemplo 6

Ratas deficientes en Fah

Las ratas (cepa Sprague Dawley) con mutaciones en el gen *Fah* altamente conservado se generaron usando nucleasas efectoras transcripcionales activadoras similares (TALEN) diseñadas para dirigirse a la secuencia del exón 3 del gen *Fah* endógeno de *Rattus norvegicus* (SEQ ID NO:21; FIG. 8), donde las partes subrayadas de la secuencia son las secuencias de unión al objetivo de dos monómeros TALEN, en cadenas de ADN opuestas, separadas por la secuencia en minúsculas donde se produce la escisión mediada por el heterodímero TALEN. Microinyección estándar del pronúcleo masculino de embriones de rata del Dahl SS (SS; SS/JrHsdMcowi) y Sprague Dawley (SD; SD/Crl) con una mezcla equimolar de dos ARNm transcritos *in vitro* que codifican cada monómero TALEN a una concentración final de 10 ng/ μ l condujo a la identificación de tres fundadores con mutaciones disruptivas putativas en el gen *Fah* utilizando el kit Surveyor Nuclease Mutation Detection (Transgenomic, Inc) como se ha descrito anteriormente (Geurts, A.M. y col., Generation of gene-specific mutated rats using zinc-finger nucleasas. *Methods Mol Biol* 597, 211-25 (2010)).

La interrupción del gen diana *Fah* de rata se confirmó usando secuenciación Sanger y los tres alelos animales mutantes se evidenciaron por micro deleciones (1-20 pares de bases) de secuencia codificante dentro del exón 3 (Figura 8 (b)). Se identificaron tres alelos mutantes (*Fah*-m1, *Fah*-m2 y *Fah*-m3). Se generaron *Fah*-m1 (deleción de 6 pb) y *Fah*-m2 (deleción de 20 pb) en el SS, mientras que se identificó *Fah*-m3 (deleción de 1 pb) en los antecedentes genéticos de la cepa de rata SD. Dos mutaciones (*Fah*-m2 y *Fah*-m3) causan un cambio de marco en la transcripción del gen naciente que cambia el marco de lectura abierto natural después de serina 69 o glicina 73, respectivamente, y el truncamiento del producto proteico mediante la inserción de codones de parada en el marco de lectura después de los aminoácidos 91 y 120, respectivamente. La mutación *Fah*-m1 da como resultado una pérdida de tres

aminoácidos y la inserción de un aminoácido (Metionina 71- Glicina 72- Lisina 73) y la inserción de un residuo de isoleucina (Figura 9; SEQ ID NOS: 22-25) de estos fundadores, tres colonias de animales mutantes (SS-Fah-m1, SS-Fah-m2 y SD-Fah-m3) se establecieron por retrocruzamiento e intercruzamiento de portadores heterocigóticos.

5 Las mutaciones en los genes *Ii2rg* y *Rag2* se generaron de manera similar en ambos entornos genéticos. Las secuencias objetivo y los alelos se muestran en la FIG. 10 (SEQ ID NO: 26-27). Se predijo que todas las mutaciones serían truncamientos de desplazamiento del marco del gen objetivo. La inactivación de ambos genes en el fondo genético de SS conduce a una deficiencia inmune severa de las poblaciones de células T y B en ambas cepas y las poblaciones de células NK disminuyen en la cepa SS-Ii2rg-m1 (Figuras 11-12).

10 La interrupción de *Fah* en la rata para los tres alelos conduce a la letalidad embrionaria ya que no se observa descendencia homocigótica en los entrecruces de animales heterocigóticos en ausencia de tratamiento. La administración de NTBC en el agua potable de heterocigóticos reproductores (8 mg/ml), sin embargo, puede rescatar los efectos letales de estas mutaciones en proporciones mendelianas o casi mendelianas, dependiendo del alelo (figura 13), lo que demuestra que este fármaco puede proteger a los embriones de ratas mutantes de la letalidad embrionaria. Los animales nulos SS-Fah-m1 mantenidos en NTBC en su agua potable son saludables y están en buena condición reproductiva. La tabla en la figura 13 muestra los genotipos de crías de ratas nacidas vivas de crías heterocigóticas. Se muestra el número de cachorros con cada genotipo esperado de las proporciones mendelianas, junto con los números realmente observados en rojo. Sin tratamiento con NTBC durante el embarazo, no nacieron crías homocigóticas mutantes. La adición de NTBC al agua potable de las madres resultó en el nacimiento de embriones mutantes con reproductores Fah-m1 y Fah-m2.

20 La retirada de NTBC de un animal adulto SS-Fah-m1, pero por otro lado con acceso *ad libitum* a alimentos y agua, conduce a una rápida disminución del peso corporal (> 20 % de pérdida en 7-8 días). El examen del tejido hepático fijo por secciones y la tinción tricrómica (figura 14) revelaron una marcada vacuolización y agrandamiento de los hepatocitos. Además, los hepatocitos necróticos se ven en grandes cantidades, mientras que ninguno se vio en el control, camada tratada con NTBC. De forma análoga, los riñones mostraron lesiones extensas, especialmente dilatación quística de los túbulos, después de la retirada de NTBC (figura 15). Estos hallazgos histológicos son típicos de la deficiencia de *Fah* en roedores.

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Yecuris Corporation
Bial, John R.
Wilson, Elizabeth M.
Geurts, Aron M.

< 120> RATAS DEFICIENTES EN FUMARILACETOACETATO HIDROLASA (FAH) E INMUNODEFICIENTES Y USOS DE LAS MISMAS

<130> N.º de expediente 44499-PCT

35 <150> US 61/527.865
<151> 26/08/2011

<160> 29

<170> PatentIn versión 3.5

40 <210> 1
<211> 82
<212> ADN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 1

gggcctcggc caagcggcat ggtgaaagga ggcaagagca tctttacaga acttactgtc 60

tgccagccaa gcccgactca ga 82

45 <210> 2
<211> 4657
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Construcción sintética

ES 2 791 829 T3

<400> 2

gcggccgcgt agcaagcttc tgtgaggcca gagaccagcc ttgacaagat attgggcctc	60
tgtgttcatt tgaatccatg cagagctctt acagtgcata aaagaaatcc attcatttgg	120
tctgagcact gtgccttctg cagttcccta cggcctgagc tctgctgcat ttaagctacc	180
acagagctga tactccaagt tactacatgt gtaacactca ctgctctgct tcataagaga	240
atggccctga gcaaagccct gggccgagca tgaaaagagg ttcgggttct tggttaagggtg	300
atgagcaact cataactaga gatcatggct ctgctttctt tcttgtcctg gatcccgtct	360
caatggaatc catgagtccc taagtaactg tgctgtgact gtcagaactg actgtcactc	420
ttctcctagc caaagccacg gattggtgtg gccatcggtg accagatctt ggacctgagt	480
gtcattaaac acctctttac cggacctgtc ctctccaaac atcagcatgt cttcgatgag	540
gtaggacatt gtgtcatgga ctgtctctgt ctcaccacct actacaaatg acatagcatc	600
ttcatagtca ccagttattc ccggatgagg aggagctggt ctgagacaca caggtggcat	660
gaggtagcct cgacacctta gggcagcttc tcaatagaat gtgagctcct gagtccagtg	720

ES 2 791 829 T3

gatctctcca agttgcctat gaggtgagac tgttgtgtta gcctggttcc tttatataca 780
aggatgttca tgctttggtc tttggaggct caggaaaacc ttgagaaaag gagccatgag 840
ccttgcagtc tagatthttag ggtaaagctt gagacactca tcctggcttc tatgttcatg 900
aatgatgact gccagctact tcaagggtac agtcctgggg catccaacct tgcttgtgtg 960
tctgtgtagg atgcctaccc tgtcatccag gtatgcagtt gtgcctgggg gcagccagct 1020
tgtctacctc gtctgtgtgg gatggatgta actttcctcc cttgtcacag ctgagctctt 1080
agggctctgct tttccctgaa acacaggcag ggatagttgt ggtatthacc aagtacctct 1140
tctgttcagg agctttgcat gaatcctttc tgccagtcct cctggccacc ctctgctaca 1200
gagccggcat tgttgctaga taagtgggac ttgtacagtt caagagttgc tgtctgcata 1260
ataataattg attgtgagat gtaaaccag aagtggatgg gacatcaggg gaggtgacag 1320
ctttctccag ctctaagcag agagggcaaa atgtaaacia aggtcccaac ttgtgaatgg 1380
atgcagagaa gtcaggctga caggaggat ggtctagggg ttttctcagg tacaacctct 1440
tctattcctg ttttggctct agacaactct caatagcttt atgggcctcg gccaaagcggc 1500
atggtgacga attctgatct accgggtagg ggaggcgctt ttcccaaggc agtctggagc 1560
atgcgcttta gcagccccgc tgggcaactg gcgctacaca agtggcctct ggcctcgcac 1620
acattccaca tccaccggtg ggcgccaacc ggctccgttc tttgggtggc ccttcgcgcc 1680
accttctact cctcccctag tcaggaagtt cccccccgcc ccgcagctcg cgtcgtgcag 1740
gacgtgacia atggaagtag cacgtctcac tagtctcgtg cagatggaca gcaccgctga 1800
gcaatggaag cgggtaggcc tttggggcag cggccaatag cagctttgct ccttcgcttt 1860
ctgggctcag aggctgggaa ggggtgggtc cgggggcggg ctgagggcg ggctcagggg 1920
cggggcgggc gcccgaaagt cctccggagg cccggcattc tgcacgcttc aaaagcgcac 1980
gtctgcccg cgtttctcct ctctctatc tccgggcctt tcgacctgca gccaatatgg 2040
gatcgccat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttg gtggagaggc 2100
tattcggcta tgactgggca caacagacia tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc 2160
tgtcagcgca ggggcgcccc gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gcctgaaatg 2220
aactgcagga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggcgct ccttgcgcag 2280
ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg 2340
ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg 2400
caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac caagcgaaac 2460
atcgcacga gcgagcacgt actcggatgg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg 2520
acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgatgc 2580
ccgacggcga tgatctcgtc gtgacctatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg 2640

ES 2 791 829 T3

aaaatggccg cttttctgga ttcacgcact gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc 2700
 aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc 2760
 gcttcctcgt gctttacggt atcgccgctc ccgattcgca gcgcacgccc ttctatcgcc 2820
 ttcttgacga gttcttctga ggggatcaat tctctagagc tcgctgatca gcctcgactg 2880
 tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg 2940
 aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg cattgtctga 3000
 gtaggtgtca ttctattctg ggggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg 3060
 aagacaatag caggcatgct ggggatgctg tgggctctat ggcttctgag gcggaagaa 3120
 ccagctgggg ctcgagatcc actagttcta aagcttgcca gccaaagcca gctcagagat 3180
 gacaaggagc ttccggcagcg gtgagaatac atggaaagag tgtcatgtca ggggagatta 3240
 ggcctgggta gttggcagta cccttctgca tgactgcttg gttacttgtc tatctatcct 3300
 ggtacagtca gccccactcc atccatcccc acagctgggt tgcatgctgg tgggaggtgt 3360
 ctgggcctgg aagactggat gaagctcctg attctgtggt tcagtgcatt cacctcccag 3420
 gcttctgcca cgatgcacct tcctgctacc ataggtgagt cctgattccc tgctttgcca 3480
 acccgaatag cttagtgggc ctagatagct agacagatgt gttggaacct catatcttgg 3540
 tggagagaaa acagatcaag agctccagga ttgccagctg atcccaatgt gaccaagctc 3600
 atggaatagt gagccttggc tcagttgtca caagcctgct ctcccagagc agcagcctaa 3660
 gttttttact acctgcatgg atacctgtat agcaatttgc ttcactcttc cagattttga 3720
 ggtaagcact ttgagcagtc aggagagagg tgttttgagg aaaaccacag gaccctgcag 3780
 ggagcatgta tacatttgac caggcatttg gtttgactga ttcagcaagt tgctgtcagt 3840
 atagtttcat agcctgaagc aggtttaggc tgcttcatct cagtatgaca gcaatgaggg 3900
 gaagcctttg ctcttgccctg ggcacctgtg gtctgagaac tgtatagctt tgctgtggga 3960
 agatggagtt tcttgaacaa gtctccccat tcaacaaaac ctttcagagg tgctggtagc 4020
 caacagctag gcagaagggtg ggcttgagga tgggctcctc tcttgcttct ctataggact 4080
 gtgctatgtg ttttttatag caagccgttt gttttctagg gatccttcat ccttcccagg 4140
 tctactgatgc tgtagcctct tgtttttact gttatggatg tgattactct tatgataaat 4200
 agtctcactg ttatctctgt ccacaggact gaaggtggga agtagtaagc acagctcaga 4260
 ctgtctgcct tttgcttagc tggctcccag aactgtttc ctctccttat tctgccgctt 4320
 atacttctag tccaggcgtc ggggttgggg tactcagctt tgctttgtgg gaggatgcag 4380
 aaggtttagg aagatgagta agcaactag cctaaatgga ttttctagta gaacttagta 4440
 actcacatat gggaggggat atctgctgtc catgaacccc caagttcagc tcatcacaat 4500

ES 2 791 829 T3

	caacagacac tgatagacaa gttcaaatac aaaggcaaga tgctttattc taggtgctaa	4560
	ggggcaggca catgacatga gagctgaacc aggacttccg ggaatggtga cattgagcaa	4620
	aagtctccat acatggaact agaggtcgcg gccgcgg	4657
	<210> 3	
	<211> 41	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 3	
	gtagcgaatt cgcgccgcg ctgtgagtc agagaccagc c	41
10	<210> 4	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 4	
	ggatagaatt cgtcacatg ccgctggcc gaggccc	37
	<210> 5	
	<211> 32	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 5	
25	gtagcaagct tgccagccaa gccagctca ga	32
	<210> 6	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 6	
	ggataggtac cgcgccgcg acctctagtt ccatgtatgg	40
	<210> 7	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 7	
40	gaggcctgt tcacacatga	20
	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	

ES 2 791 829 T3

	<400> 8 ctaaagcgca tgctccagac	20
5	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 9 attgcatcgc attgtctgag	20
	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 10 agtctcctgc agagggaaca	20
20	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
25	<400> 11 tgctcctgcc gagaaagtat	20
	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 12 caacagatgg ctggcaacta	20
35	<210> 13 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 13 gtagcgaatt cgcgccgcg ctgtgagtc agagaccagc c	41
45	<210> 14 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 14 tagtcgacgt caaggatgct cttgcctcct	30

ES 2 791 829 T3

	<210> 15	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 15	
	gcaggtgggtg ccactgtcc ccagttgagg	30
10	<210> 16	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
15	<400> 16	
	gtatgcatat cgatggaatt cccctttcca	30
20	<210> 17	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 17	
	gtagcgaatt cgcgccgct gattggattc tcggtgtga	39
25	<210> 18	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 18	
	ggatagaatt cgtcagtggc tgcaactctg gaatgtatta tt	42
35	<210> 19	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 19	
	gtagcaagct taggcgagcc gaacagaagc taaac	35
45	<210> 20	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 20	
	ggataggtagc cgcgccgcc agggataagc acagcttcc	39
50	<210> 21	
	<211> 55	
	<212> ADN	

ES 2 791 829 T3

<213> Rattus norvegicus

<400> 21

cttagacaac tctcaatagc ttatgggcc tcggccaagc ggcatggaag gaggc 55

<210> 22

<211> 419

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 22

Met Ser Phe Ile Pro Val Ala Glu Asp Ser Asp Phe Pro Ile Gln Asn
1 5 10 15

Leu Pro Tyr Gly Val Phe Ser Thr Gln Ser Asn Pro Lys Pro Arg Ile
20 25 30

Gly Val Ala Ile Gly Asp Gln Ile Leu Asp Leu Ser Val Ile Lys His
35 40 45

Leu Phe Thr Gly Pro Val Leu Ser Lys His Gln His Val Phe Asp Glu

5

ES 2 791 829 T3

50						55										60
Thr 65	Thr	Leu	Asn	Ser	Phe 70	Met	Gly	Leu	Gly	Gln 75	Ala	Ala	Trp	Lys	Glu 80	
Ala	Arg	Ala	Ser	Leu 85	Gln	Asn	Leu	Leu	Ser 90	Ala	Ser	Gln	Ala	Gln 95	Leu	
Arg	Asp	Asp	Lys 100	Glu	Leu	Arg	Gln	Arg 105	Ala	Phe	Thr	Ser	Gln 110	Ala	Ser	
Ala	Thr	Met 115	His	Leu	Pro	Ala	Thr 120	Ile	Gly	Asp	Tyr	Thr 125	Asp	Phe	Tyr	
Ser 130	Ser	Leu	Gln	His	Ala	Thr 135	Asn	Val	Gly	Ile	Met 140	Phe	Arg	Gly	Lys	
Glu 145	Asn	Ala	Leu	Leu	Pro 150	Asn	Trp	Leu	His	Leu 155	Pro	Val	Gly	Tyr	His 160	
Gly	Arg	Ala	Ser	Ser 165	Val	Val	Val	Ser	Gly 170	Thr	Pro	Ile	Arg	Arg 175	Pro	
Met	Gly	Gln	Met 180	Arg	Pro	Asp	Asn	Ser 185	Lys	Pro	Pro	Val	Tyr 190	Gly	Ala	
Ser	Lys	Arg 195	Leu	Asp	Met	Glu	Leu 200	Glu	Met	Ala	Phe	Phe 205	Val	Gly	Pro	
Gly 210	Asn	Arg	Phe	Gly	Glu	Pro 215	Ile	Pro	Ile	Ser	Lys 220	Ala	Gln	Glu	His	
Ile 225	Phe	Gly	Met	Val	Leu 230	Met	Asn	Asp	Trp	Ser 235	Ala	Arg	Asp	Ile	Gln 240	
Gln	Trp	Glu	Tyr	Val 245	Pro	Leu	Gly	Pro	Phe 250	Leu	Gly	Lys	Ser	Phe 255	Gly	
Thr	Thr	Ile	Ser 260	Pro	Trp	Val	Val	Pro 265	Met	Asp	Ala	Leu	Met 270	Pro	Phe	
Val	Val	Pro 275	Asn	Pro	Lys	Gln	Asp 280	Pro	Lys	Pro	Leu	Pro 285	Tyr	Leu	Cys	
His 290	Ser	Gln	Pro	Tyr	Thr	Phe 295	Asp	Ile	Asn	Leu	Ser 300	Val	Ala	Leu	Lys	

ES 2 791 829 T3

Gly Glu Gly Met Ser Gln Ala Ala Thr Ile Cys Arg Ser Asn Phe Lys
305 310 315 320

His Met Tyr Trp Thr Ile Leu Gln Gln Leu Thr His His Ser Val Asn
325 330 335

Gly Cys Asn Leu Arg Pro Gly Asp Leu Leu Ala Ser Gly Thr Ile Ser
340 345 350

Gly Ser Asp Pro Glu Ser Phe Gly Ser Met Leu Glu Leu Ser Trp Lys
355 360 365

Gly Thr Lys Ala Ile Asp Val Gly Gln Gly Gln Thr Arg Thr Phe Leu
370 375 380

Leu Asp Gly Asp Glu Val Ile Ile Thr Gly His Cys Gln Gly Asp Gly
385 390 395 400

Tyr Arg Val Gly Phe Gly Gln Cys Ala Gly Lys Val Leu Pro Ala Leu
405 410 415

Ser Pro Ala

- <210> 23
- <211> 417
- <212> PRT
- <213> Rattus norvegicus

5

<400> 23

Met Ser Phe Ile Pro Val Ala Glu Asp Ser Asp Phe Pro Ile Gln Asn
1 5 10 15

Leu Pro Tyr Gly Val Phe Ser Thr Gln Ser Asn Pro Lys Pro Arg Ile
20 25 30

Gly Val Ala Ile Gly Asp Gln Ile Leu Asp Leu Ser Val Ile Lys His
35 40 45

Leu Phe Thr Gly Pro Val Leu Ser Lys His Gln His Val Phe Asp Glu
50 55 60

Thr Thr Leu Asn Ser Phe Ile Gly Gln Ala Ala Trp Lys Glu Ala Arg
65 70 75 80

Ala Ser Leu Gln Asn Leu Leu Ser Ala Ser Gln Ala Gln Leu Arg Asp
85 90 95

ES 2 791 829 T3

Asp Lys Glu Leu Arg Gln Arg Ala Phe Thr Ser Gln Ala Ser Ala Thr
 100 105 110
 Met His Leu Pro Ala Thr Ile Gly Asp Tyr Thr Asp Phe Tyr Ser Ser
 115 120 125
 Leu Gln His Ala Thr Asn Val Gly Ile Met Phe Arg Gly Lys Glu Asn
 130 135 140
 Ala Leu Leu Pro Asn Trp Leu His Leu Pro Val Gly Tyr His Gly Arg
 145 150 155 160
 Ala Ser Ser Val Val Val Ser Gly Thr Pro Ile Arg Arg Pro Met Gly
 165 170 175
 Gln Met Arg Pro Asp Asn Ser Lys Pro Pro Val Tyr Gly Ala Ser Lys
 180 185 190
 Arg Leu Asp Met Glu Leu Glu Met Ala Phe Phe Val Gly Pro Gly Asn
 195 200 205
 Arg Phe Gly Glu Pro Ile Pro Ile Ser Lys Ala Gln Glu His Ile Phe
 210 215 220
 Gly Met Val Leu Met Asn Asp Trp Ser Ala Arg Asp Ile Gln Gln Trp
 225 230 235 240
 Glu Tyr Val Pro Leu Gly Pro Phe Leu Gly Lys Ser Phe Gly Thr Thr
 245 250 255
 Ile Ser Pro Trp Val Val Pro Met Asp Ala Leu Met Pro Phe Val Val
 260 265 270
 Pro Asn Pro Lys Gln Asp Pro Lys Pro Leu Pro Tyr Leu Cys His Ser
 275 280 285
 Gln Pro Tyr Thr Phe Asp Ile Asn Leu Ser Val Ala Leu Lys Gly Glu
 290 295 300
 Gly Met Ser Gln Ala Ala Thr Ile Cys Arg Ser Asn Phe Lys His Met
 305 310 315 320
 Tyr Trp Thr Ile Leu Gln Gln Leu Thr His His Ser Val Asn Gly Cys
 325 330 335
 Asn Leu Arg Pro Gly Asp Leu Leu Ala Ser Gly Thr Ile Ser Gly Ser
 340 345 350

ES 2 791 829 T3

Asp Pro Glu Ser Phe Gly Ser Met Leu Glu Leu Ser Trp Lys Gly Thr
 355 360 365

Lys Ala Ile Asp Val Gly Gln Gly Gln Thr Arg Thr Phe Leu Leu Asp
 370 375 380

Gly Asp Glu Val Ile Ile Thr Gly His Cys Gln Gly Asp Gly Tyr Arg
 385 390 395 400

Val Gly Phe Gly Gln Cys Ala Gly Lys Val Leu Pro Ala Leu Ser Pro
 405 410 415

Ala

<210> 24
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 24

5

Met Ser Phe Ile Pro Val Ala Glu Asp Ser Asp Phe Pro Ile Gln Asn
 1 5 10 15

Leu Pro Tyr Gly Val Phe Ser Thr Gln Ser Asn Pro Lys Pro Arg Ile
 20 25 30

Gly Val Ala Ile Gly Asp Gln Ile Leu Asp Leu Ser Val Ile Lys His
 35 40 45

Leu Phe Thr Gly Pro Val Leu Ser Lys His Gln His Val Phe Asp Glu
 50 55 60

Thr Thr Leu Asn Ser Gly Met Glu Gly Gly Lys Ser Ile Leu Thr Glu
 65 70 75 80

Leu Thr Val Cys Gln Pro Ser Pro Ala Gln Arg
 85 90

<210> 25
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 25

10

Met Ser Phe Ile Pro Val Ala Glu Asp Ser Asp Phe Pro Ile Gln Asn
 1 5 10 15

ES 2 791 829 T3

Leu Pro Tyr Gly Val Phe Ser Thr Gln Ser Asn Pro Lys Pro Arg Ile
 20 25 30

Gly Val Ala Ile Gly Asp Gln Ile Leu Asp Leu Ser Val Ile Lys His
 35 40 45

Leu Phe Thr Gly Pro Val Leu Ser Lys His Gln His Val Phe Asp Glu
 50 55 60

Thr Thr Leu Asn Ser Phe Met Gly Ser Ala Lys Arg His Gly Arg Arg
 65 70 75 80

Gln Glu His Pro Tyr Arg Thr Tyr Cys Leu Pro Ala Lys Pro Ser Ser
 85 90 95

Glu Met Thr Arg Ser Phe Gly Ser Val His Ser Pro Pro Arg Leu Leu
 100 105 110

Pro Arg Cys Thr Phe Leu Leu Pro
 115 120

5 <210> 26
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Rattus norvegicus

<400> 26
 ctcagtggtc ctactctgcc cctcccagag gtcaatgct ttgtgtcaa tgtcg 55

10 <210> 27
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Rattus norvegicus

<400> 27
 atgtcagaag cattctatt ctatatgttg agatgctctg aagataattc gagtgagg 58

15 <210> 28
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 28

Ala Ser Ala Lys Arg His Gly Glu Arg Arg Gln Glu His Leu Tyr Arg
 1 5 10 15

Thr Tyr Cys Leu Pro Ala Lys Pro Ser Ser
 20 25

20 <210> 29
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 29

ES 2 791 829 T3

Met Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile
 1 5 10 15

Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val
 20 25 30

Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp
 35 40 45

Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly
 50 55 60

Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln
 65 70 75 80

Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp
 85 90 95

Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe
 100 105 110

Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala
 115 120 125

Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val
 130 135 140

Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu
 145 150

REIVINDICACIONES

1. Una rata genéticamente modificada deficiente en *Fah* cuyo genoma es homocigótico para una interrupción en el gen *Fah* de tal manera que la interrupción da como resultado la pérdida de expresión de la proteína FAH funcional y una disminución de la función hepática.
- 5 2. La rata deficiente en *Fah* de la reivindicación 1, en la que la interrupción es una inserción, en la que la inserción comprende un codón de terminación, un marcador seleccionable, o ambos.
3. La rata deficiente en *Fah* de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la interrupción está en el exón 3 del gen *Fah*.
- 10 4. La rata deficiente en *Fah* de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la rata está inmunodeprimida, en la que la inmunosupresión es el resultado de la administración de uno o más agentes inmunosupresores, o en la que la inmunosupresión es el resultado de una o más alteraciones genéticas que inhiben el desarrollo de células inmunitarias funcionales.
- 15 5. La rata deficiente en *Fah* de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la rata está inmunodeprimida o es inmunodeficiente y comprende hepatocitos heterólogos trasplantados, en la que los hepatocitos heterólogos son hepatocitos de mamífero de un mamífero seleccionado del grupo que consiste en perros, cerdos, caballos, conejos, ratones, titíes, marmotas, primates no humanos y seres humanos.
6. La rata deficiente en *Fah* de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la rata está inmunodeprimida o es inmunodeficiente y comprende hepatocitos humanos trasplantados.
7. Un procedimiento de expansión de hepatocitos heterólogos *in vivo*, que comprende:
 - 20 trasplantar hepatocitos heterólogos en una primera rata deficiente en *Fah* según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicha rata está inmunodeprimida o es inmunodeficiente y permitir que los hepatocitos heterólogos se expandan, expandiéndose así los hepatocitos heterólogos *in vivo*.
 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que los hepatocitos heterólogos trasplantados en la primera rata deficiente en *Fah* son hepatocitos humanos aislados.
 - 25 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que los hepatocitos humanos se aíslan del hígado de un mamífero humanizado no humano antes del trasplante en la primera rata deficiente en *Fah*, en el que el mamífero no humano es un ratón FRG KO.
 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, que comprende además administrar un vector que codifica uroquinasa a la primera rata deficiente en *Fah* antes de trasplantar los hepatocitos heterólogos.
 - 30 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, que comprende además recolectar los hepatocitos heterólogos expandidos de la primera rata deficiente en *Fah*.
 12. El procedimiento de la reivindicación 11, que comprende además expandir los hepatocitos heterólogos recolectados mediante trasplante en serie, en el que dicho trasplante en serie comprende:
 - 35 recolectar los hepatocitos heterólogos expandidos de la primera rata deficiente en *Fah*;
 - trasplantar los hepatocitos heterólogos expandidos recogidos de la primera rata deficiente en *Fah* en una segunda rata deficiente en *Fah* según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6; y
 - permitir que los hepatocitos heterólogos se expandan, expandiéndose así los hepatocitos heterólogos *in vivo*.
 13. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la rata es una rata inmunodeficiente, en el que la inmunodeficiencia de la rata se debe a una alteración genética, inmunosupresión, o una combinación de los mismos.
 - 40 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la inmunodeficiencia se debe a una o más alteraciones genéticas que inhiben el desarrollo de células inmunitarias funcionales, en el que la una o más alteraciones genéticas se seleccionan del grupo que consiste en deficiencia de *Rag1*, deficiencia de *Rag2*, deficiencia de *Ii2rg*, SCID, $\text{SIRP-}\alpha^{\text{hum/hum}}$, desnudo, perforina^{-/-} y sus combinaciones.

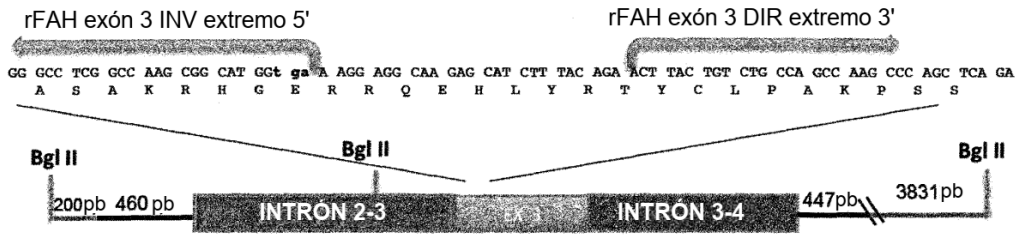


Fig. 1

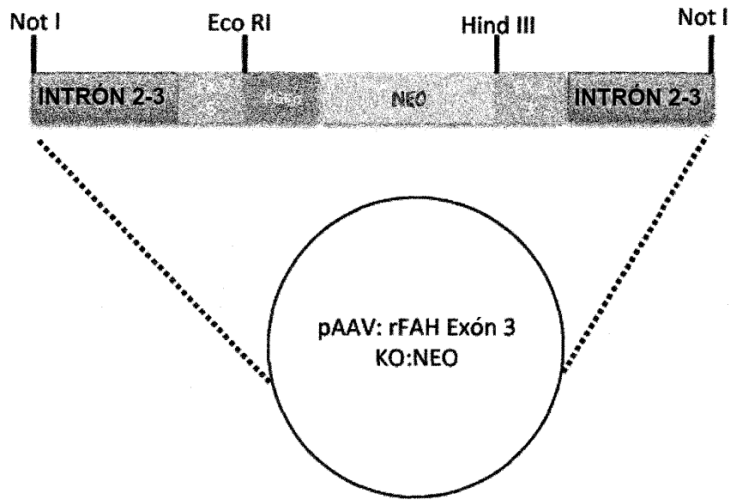


Fig. 2



Fig. 3

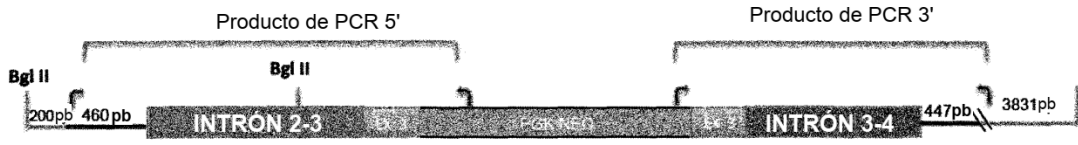
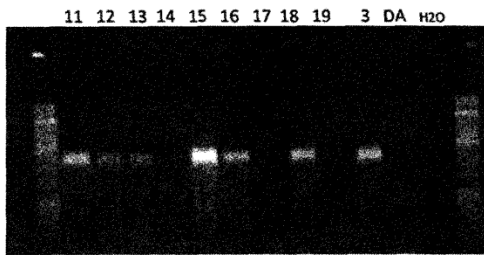


Fig. 4

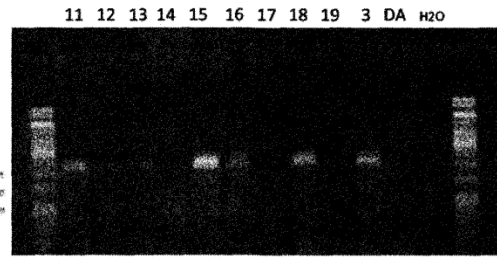
A.

5' rFAH KO + NEO INV



PM previsto = 2,1

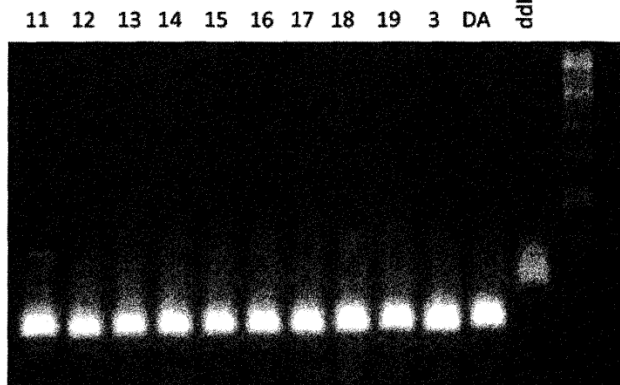
NEO DIR + 3' rFAH KO



PM previsto = 2,1

B.

Producto de PCR control



PM esperado = 450 pb

Fig. 5

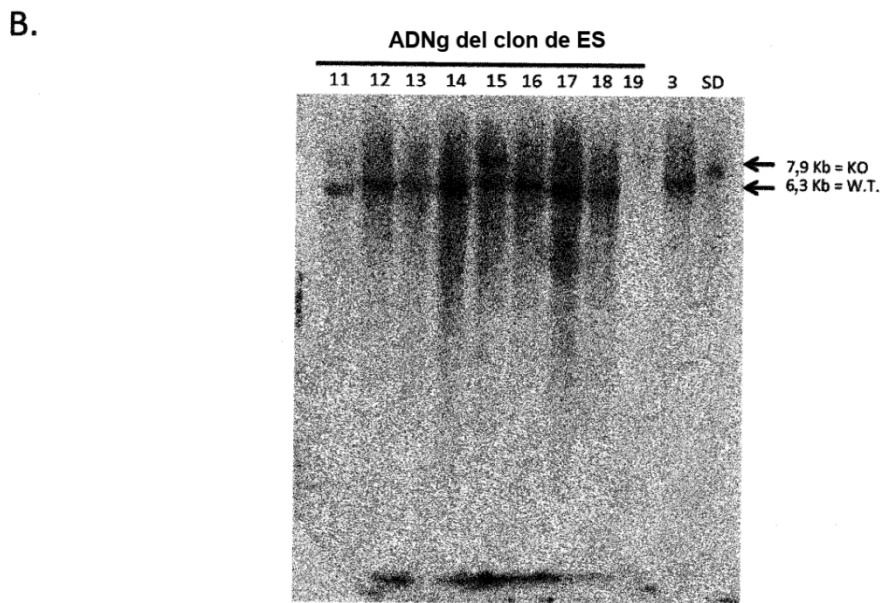
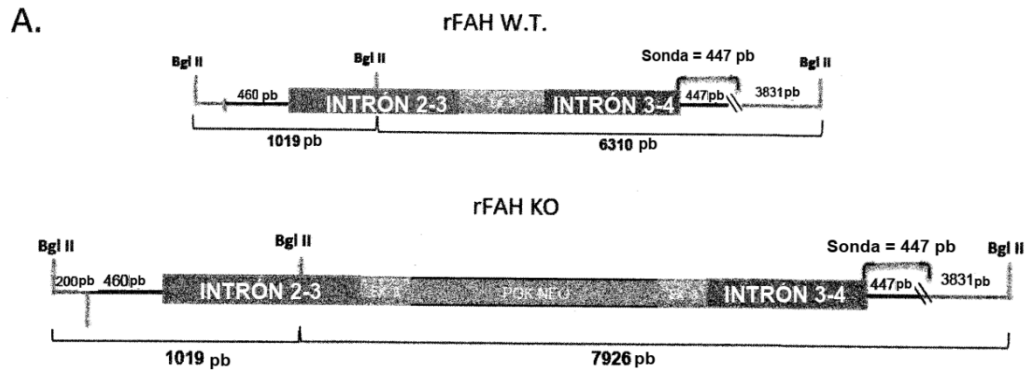
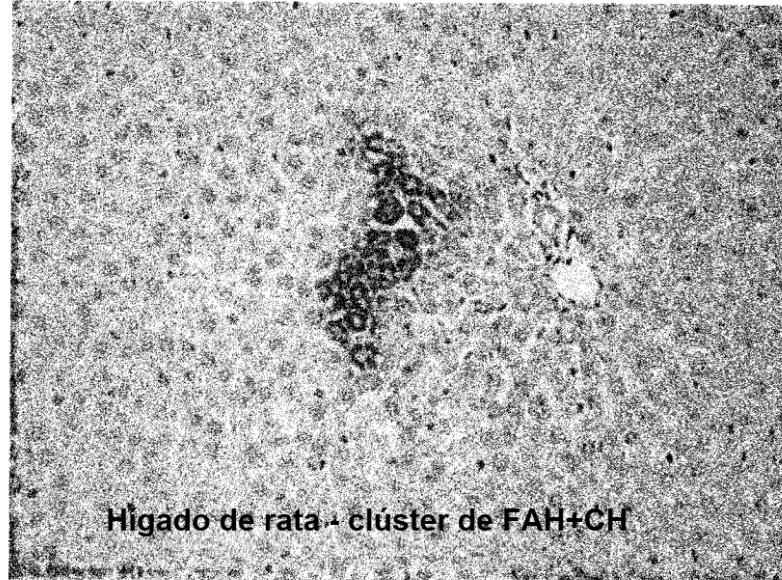


Fig. 6

A.



B.

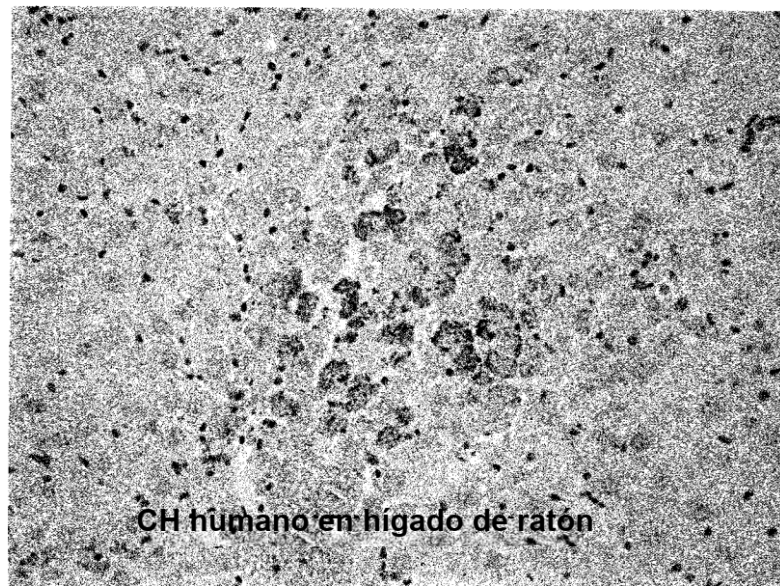


Fig. 7

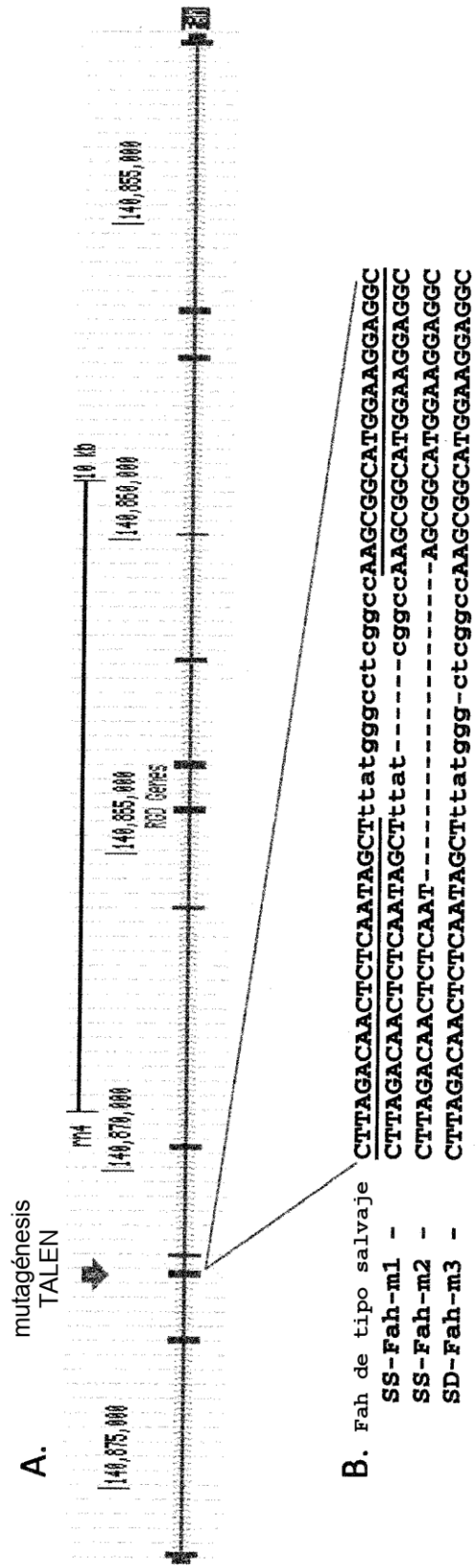


Fig. 8

1

100

FAH (1) MSFIPVAEDSDPPIQNLPYGVFSTQSNPKPRIGVAIGDQIILDLSVIKHLFTGPPVLSKHQHVDETTILNSFMGLQQAAWKEARASLQNLLSASQAQLRDDK
FAH-m1 (1) MSFIPVAEDSDPPIQNLPYGVFSTQSNPKPRIGVAIGDQIILDLSVIKHLFTGPPVLSKHQHVDETTILNSF-I-CQAAWKEARASLQNLLSASQAQLRDDK
FAH-m2 (1) MSFIPVAEDSDPPIQNLPYGVFSTQSNPKPRIGVAIGDQIILDLSVIKHLFTGPPVLSKHQHVDETTILNSGME-----GKK-SILTELTVCCPS-PA
FAH-m3 (1) MSFIPVAEDSDPPIQNLPYGVFSTQSNPKPRIGVAIGDQIILDLSVIKHLFTGPPVLSKHQHVDETTILNSFMGS-----AKRHRRQEHYRXYCLPAKPS

200

FAH (101) ELRQRAFTSQASATMHLPATIGDYTDYSSLQHA TNVGI MFRGKENALLPNWLHLPVGYHGRASSVVVSGTPIRRPMGQMRPDNSKPPVYGASKRLDMEL
FAH-m1 (99) ELRQRAFTSQASATMHLPATIGDYTDYSSLQHA TNVGI MFRGKENALLPNWLHLPVGYHGRASSVVVSGTPIRRPMGQMRPDNSKPPVYGASKRLDMEL
FAH-m2 (90) QR-----
FAH-m3 (96) SEMTRSFSGSVHSPRLLPRTCFLLP-----

300

FAH (201) EMAFFVGPGRFGEPIPI SKAQEHIFGMVLMNDWSARDIQOWEYVPLGPFGLKSGFTTISPVVVPMDALMPFVVPNPKQDEKPLPYLCHSQPYTTFDINLS
FAH-m1 (199) EMAFFVGPGRFGEPIPI SKAQEHIFGMVLMNDWSARDIQOWEYVPLGPFGLKSGFTTISPVVVPMDALMPFVVPNPKQDEKPLPYLCHSQPYTTFDINLS
FAH-m2 (92) -----
FAH-m3 (121) -----

400

FAH (301) VALKGEGMSQAATICRSNFKHMYWTILQQLTHHSVNGCNLRFPGDLLASGTISGSDPESFGSMLELSWKGTKAIDVGGQTRTFLLLDGDEVIIITGHCQGDG
FAH-m1 (299) VALKGEGMSQAATICRSNFKHMYWTILQQLTHHSVNGCNLRFPGDLLASGTISGSDPESFGSMLELSWKGTKAIDVGGQTRTFLLLDGDEVIIITGHCQGDG
FAH-m2 (92) -----
FAH-m3 (121) -----

401

FAH (401) YRVFGQCAGKVLPA LSPA 419
FAH-m1 (399) YRVFGQCAGKVLPA LSPA
FAH-m2 (92) -----
FAH-m3 (121) -----

Fig. 9

Il2rg de tipo salvaje

Il2rg wild type - CTCAGTGTTCCTACTCTgcccctcccagaggttcaATGCTTTGTGTTCAATGTCG
 SS-Il2rg-m1 - CTCAGTGTTCCTACTCTgcccct-----GTGTTCAATGTCG
 SD-Il2rg-m2 - CTCAGTGTTCCTACTCTgcccctccc-gaggttcaATGCTTTGTGTTCAATGTCG
 SD-Il2rg-m3 - CTCAGTGTTCCTACTCTgcccctcc-a-aggttcaATGCTTTGTGTTCAATGTCG

Rag2 de tipo salvaje - ATGTCAGAAGCATTCTATTTCTatagtgtgagatgctctgAAGATAATTCGAGTGAGG
 SS-Rag2-m1 - ATGTCAGAAGCATTCTATTTCTat-----atgctctgAAGATAATTCGAGTGAGG
 SD-Rag2-m2 - ATGTCAGAAGCATTCTATTTCTatagtgt--gatgctctgAAGATAATTCGAGTGAGG

Fig. 10

SS-Il2rg-m1

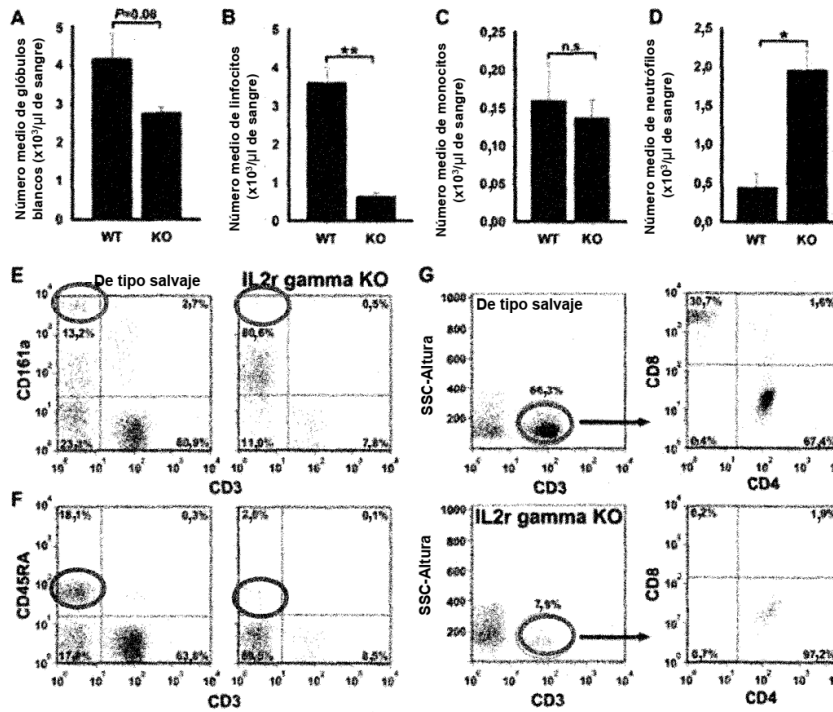


Fig. 11

SS-Rag2-m1

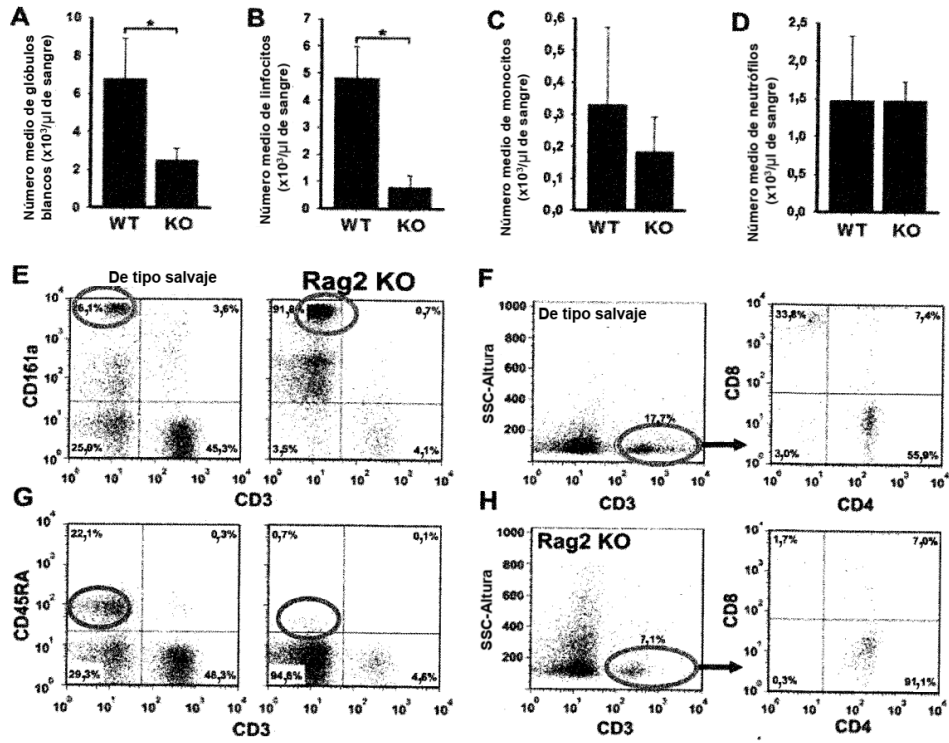


Fig. 12

Tabla 1: Genotipos de la descendencia de intercruzamientos heterocigóticos con y sin NTBC

		sin NTBC		NTBC 8 mg/ml	
Símbolo del gen	Estado genético	Esperado	Observado	Esperado	Observado
SS-Fah-m1	Homocigótico	26	0	26	35
	Heterocigótico	56	58	53	50
	Tipo salvaje	26	46	26	20
SS-Fah-m2	Homocigótico	16	0	21	8
	Heterocigótico	31	41	41	46
	Tipo salvaje	16	22	21	29
SD-Fah-m3	Homocigótico	7	0	ND	ND
	Heterocigótico	16	11	ND	ND
	Tipo salvaje	7	19	ND	ND

Fig. 13

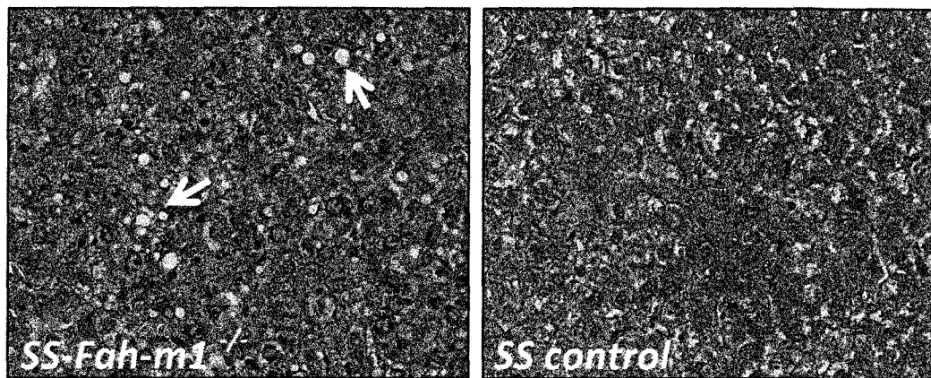


Fig. 14

Rata deficiente en Fah

Hermano de camada de control

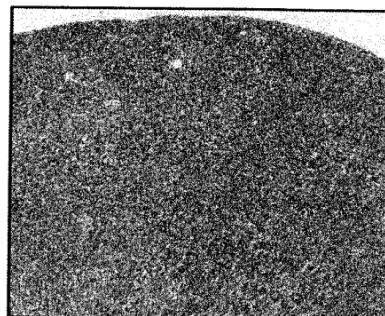
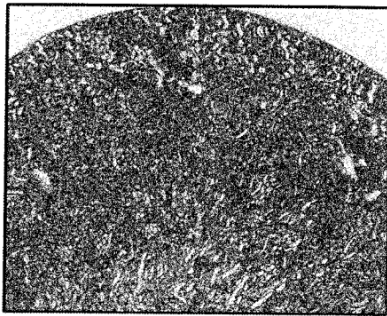


Fig. 15