

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 379**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2014** **PCT/US2014/060568**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015** **WO2015057758**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2014** **E 14790452 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016** **EP 2908626**

54 Título: **Animales con IL-15 humanizada**

30 Prioridad:

15.10.2013 US 201361891013 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
24.05.2017

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

ROJAS, JOSE F.;
LAI, KA-MAN VENUS y
MURPHY, ANDREW J.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 613 379 T3

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

DESCRIPCIÓN

Animales con IL-15 humanizada

5 Campo de la invención

Animales no humanos que comprenden en su línea germinal un locus endógeno humanizado de IL-15 no humana. Animales no humanos que comprenden en su línea germinal una secuencia que codifica una IL-15 humanizada bajo el control de elementos reguladores no humanos endógenos. Animales no humanos (por ejemplo, mamíferos, *por ejemplo*, roedores tales como ratones, ratas, y hámsteres) que comprenden una modificación genética; dicha modificación genética comprende una sustitución, en un locus endógeno, de una secuencia génica de IL-15 no humana con una secuencia génica de IL-15 humana o humanizada. Roedores y otros animales no humanos que expresan IL-15 humana o humanizada a partir de un locus endógeno modificado de IL-15 no humana. Animales no humanos que expresan IL-15 humana o humanizada bajo el control de un promotor y/o secuencias reguladoras de IL-15 no humana.

Antecedentes de la invención

En la técnica se conocen ratones transgénicos con transgenes insertados aleatoriamente que contienen una secuencia de IL-15 humana. Sin embargo, los ratones transgénicos que expresan IL-15 humana a partir de transgenes integrados aleatoriamente no son óptimos en un aspecto u otro. Por ejemplo, la mayoría de los ratones transgénicos para la IL-15 humana exhiben niveles y/o relaciones anormales de ciertas células, que incluyen linfocitos (*por ejemplo*, células T), debido, probablemente, a una desregulación de la función de las células inmunológicas. Tales ratones exhiben, además, una panoplia de patologías, debido, presumiblemente, en última instancia a una desregulación de la IL-15 transgénica. Esta desregulación puede ser el resultado, *por ejemplo*, de la ausencia de elementos de control endógenos, y/o la colocación de la secuencia de IL-15 humana lejos del locus endógeno de IL-15.

En la técnica aún existe la necesidad de animales no humanos que comprendan secuencias que codifican IL-15 humana, en donde las secuencias que codifican IL-15 humana se encuentren en un locus endógeno de IL-15 no humano, y/o estén bajo el control regulador de elementos endógenos de IL-15 no humana (*por ejemplo*, regiones no codificantes corriente arriba y/o corriente abajo). En la técnica existe la necesidad de animales no humanos que expresen IL-15 humana bajo el control de elementos reguladores no humanos endógenos. En la técnica existe la necesidad de animales no humanos que expresen IL-15 humana de una manera que sea relevante fisiológicamente en el animal no humano. En la técnica existe la necesidad de animales no humanos que expresen una IL-15 humana, en donde los animales no humanos carecen de una anomalía significativa en poblaciones de linfocitos, *por ejemplo*, en poblaciones de células T. Además, en la técnica existe la necesidad de animales no humanos que expresen IL-15 humana o humanizada, y que carezcan de una o más de las patologías que exhiben los animales no humanos que son transgénicos para la IL-15 humana. Ohta y otros (J. Immunol, 169: págs. 460-468 (2002) describe las células T CD8+NK1.1+ de tipo Th1 resistentes a la muerte celular inducida por activación, dependientes de IL-15, para el desarrollo de inflamación del intestino delgado. Marks-Konczalik y otros (PNAS, 97: págs. 11445-11450 (2000)) describe que la muerte celular inducida por la activación que se induce por IL-2 se encuentra inhibida en ratones transgénicos para IL-15. La patente WO01/58914 describe haplotipos del gen de IL-5. Fehniger y otros (Blood Cells, Molecules and Diseases, 27: págs. 223-230 (2001)) describe la leucemia fatal en ratones transgénicos para Interleucina-15. La patente WO2003/063556 describe la IL-6 y el receptor de IL-6 humanizados. Devoy y otros (Nat. Rev. Genetics, 13: págs. 14-20 (2012)) describe ratones con genoma humanizado. Steel y otros (Trends in Pharmacological Sciences, 33: págs. 35-41 (2011)) describe la biología de la IL-15 y sus implicaciones terapéuticas en el cáncer.

50 Sumario

La invención proporciona un ratón modificado genéticamente, cuyo genoma comprende una sustitución en un locus endógeno de IL-15 de ratón, de un fragmento genómico de ratón que codifica un polipéptido maduro de IL-15 de ratón, con un segmento genómico humano que codifica un polipéptido maduro de IL-15 humana en donde los exones de IL-15 humana en dicho segmento genómico humano consisten en los exones 3, 4, 5 y 6 codificantes de la proteína IL-15 humana, para formar un gen de IL-15 humanizado, en donde los exones de IL-15 se encuentran enumerados con el primer exón codificante como el exón 1, y en donde el gen de IL-15 humanizado está bajo el control de todos los elementos reguladores endógenos corriente arriba de IL-15 de ratón en el locus endógeno de IL-15 de ratón.

La invención proporciona, además, un método para producir un ratón modificado genéticamente; el método comprende modificar el genoma de un ratón mediante la sustitución de un fragmento genómico de ratón que codifica un polipéptido maduro de IL-15 de ratón en el locus endógeno de IL-15 de ratón con un segmento genómico humano que codifica un polipéptido maduro de IL-15 humana en donde los exones de IL-15 humana en dicho segmento genómico humano consisten en los exones 3, 4, 5 y 6 codificantes de la proteína IL-15 humana, para formar un gen de IL-15 humanizado, en donde los exones de IL-15 se encuentran enumerados con el primer exón codificante como

el exón 1, y en donde el gen de IL-15 humanizado está bajo el control de todos los elementos reguladores endógenos corriente arriba de IL-15 de ratón en el locus endógeno de IL-15 de ratón.

La invención proporciona, además, un ratón modificado genéticamente, cuyo genoma comprende un gen de IL-15 humanizado, en donde dicho gen de IL-15 humanizado comprende los exones 1 y 2 codificantes de la proteína IL-15 de ratón y un segmento genómico humano en donde los exones de IL-15 humana en dicho segmento genómico humano consisten en los exones 3, 4, 5 y 6 codificantes de la proteína IL-15 humana, en donde los exones de IL-15 se encuentran enumerados con el primer exón codificante como el exón 1, y en donde el gen de IL-15 humanizado está bajo el control de todos los elementos reguladores corriente arriba de IL-15 de ratón de un locus endógeno de IL-15 de ratón, y dicho gen de IL-15 humanizado codifica una proteína que comprende una secuencia polipeptídica madura de IL-15 humana.

La invención proporciona, además, un método para producir un ratón modificado genéticamente; el método comprende introducir en el genoma de un ratón un gen de IL-15 humanizado que comprende los exones 1 y 2 codificantes de la proteína IL-15 de ratón y un segmento genómico humano en donde los exones de IL-15 humana en dicho segmento genómico humano consisten en los exones 3, 4, 5 y 6 de IL-15 humana, en donde los exones de IL-15 se encuentran enumerados con el primer exón codificante como el exón 1, y en donde el gen de IL-15 humanizado está bajo el control de todos los elementos reguladores corriente arriba de IL-15 de ratón de un locus endógeno de IL-15 de ratón, y dicho gen de IL-15 humanizado codifica una proteína que comprende una secuencia polipeptídica madura de IL-15 humana.

Se describen organismos no humanos modificados genéticamente que comprenden un locus de IL-15 humanizado. Se describen organismos no humanos que comprenden un gen de IL-15 humanizado, en donde el gen de IL-15 humanizado está bajo el control de uno o más elementos reguladores no humanos endógenos. Se describen organismos no humanos que comprenden un gen de IL-15 humanizado en un locus endógeno de IL-15 no humano. Se describen organismos no humanos que comprenden un locus endógeno de IL-15 humanizado que es capaz de transferirse a través de la línea germinal de los organismos. Se describen animales no humanos, *por ejemplo*, mamíferos (por ejemplo, roedores, *por ejemplo*, ratones o ratas) que expresan IL-15 humana a partir de un locus endógeno de IL-15 modificado, en donde la IL-15 expresada es completamente o parcialmente humana.

Se describen animales, embriones, células, tejidos, y ácidos nucleicos no humanos modificados genéticamente, que comprenden una secuencia genómica de IL-15 humana regulada por un control regulador de IL-15 no humana. Los animales no humanos expresan una proteína IL-15 humanizada, o una proteína IL-15 completamente humana (por ejemplo, una proteína IL-15 madura completamente humana), y no exhiben una o más de las patologías de los animales no humanos transgénicos para la IL-15 humana que se conocen en la técnica. Los animales no humanos pueden ser mamíferos, *por ejemplo*, roedores, *por ejemplo*, ratones, ratas, hámsteres, *etcétera*. El mamífero puede ser un roedor; el roedor puede ser un ratón o una rata.

Se describen animales, embriones, células, tejidos, y ácidos nucleicos no humanos modificados genéticamente, que comprenden una secuencia genómica de IL-15 humana en un locus endógeno de IL-15 no humano. Los animales no humanos expresan una proteína IL-15 humanizada, o una proteína IL-15 completamente humana (por ejemplo, una proteína IL-15 madura completamente humana), a partir de un locus no humano endógeno modificado regulado por una o más secuencias reguladoras no humanas endógenas del locus endógeno de IL-15 modificado, y no exhiben una o más de las patologías de los animales no humanos transgénicos para la IL-15 humana que se conocen en la técnica. Los animales no humanos pueden ser mamíferos, *por ejemplo*, roedores, *por ejemplo*, ratones, ratas, hámsteres, *etcétera*. El mamífero puede ser un roedor; el roedor puede ser un ratón o una rata.

Los animales no humanos pueden comprender un locus de IL-15 modificado en el genoma del animal no humano de manera que el locus de IL-15 modificado es capaz de transferirse a través de la línea germinal, en donde el locus endógeno de IL-15 modificado comprende una humanización de al menos una porción codificante de proteína madura del locus endógeno de IL-15. Los animales no humanos pueden ser mamíferos. Los mamíferos pueden ser roedores, y los roedores son heterocigotos u homocigotos con respecto al locus de IL-15 modificado. Los roedores pueden seleccionarse de ratones y ratas. Los ratones y ratas pueden ser homocigotos para el locus de IL-15 modificado, y son incapaces de expresar una proteína IL-15 endógena que sea completamente de ratón o completamente de rata, y los ratones y ratas expresan una proteína IL-15 humana madura.

Se describe un animal no humano que comprende un primer alelo de IL-15 silvestre endógeno, y una humanización de un segundo alelo de IL-15 endógeno.

Se describe un animal no humano que comprende una carencia de un primer alelo de IL-15 endógeno y una humanización de un segundo alelo de IL-15 endógeno.

Se describe un animal no humano que comprende una carencia de un alelo de IL-15 endógeno funcional, y comprende al menos una copia de un alelo de IL-15 humanizado bajo el control de elementos reguladores no humanos endógenos. La al menos una copia de un alelo de IL-15 humanizado puede estar en un locus endógeno de IL-15.

La humanización puede ser de uno o más exones y/o intrones en el locus endógeno de IL-15 no humano. Se describen animales no humanos que tienen un locus de IL-15 modificado en donde una región 5' no traducida endógena no humana o una región 3' no traducida endógena no humana, o ambas, se conservan en el animal no humano modificado.

La humanización del locus endógeno de IL-15 no humano puede ser con una región codificante (o fragmento de esta) que es un fragmento genómico de un locus de IL-15 humano que comprende al menos un exón codificante de la proteína IL-15 humana.

La humanización del locus endógeno de IL-15 no humano puede ser con una región codificante que es un fragmento genómico de un locus de IL-15 humano que comprende cada exón codificante de la proteína IL-15 humana, pero no comprende un exón codificante de la proteína IL-15 no humana.

El locus de IL-15 que comprende el fragmento genómico humano puede dar como resultado la expresión de una proteína IL-15 que cuando madura es completamente humana. La humanización del locus endógeno de IL-15 no humano puede ser con un ADNc que codifica una proteína IL-15 humana, de manera que tras el procesamiento en el animal no humano la proteína IL-15 madura producida por el locus humanizado es completamente humana.

Se describe un animal no humano modificado genéticamente que comprende un locus endógeno de IL-15 humanizado en su totalidad o en parte, en donde el locus de IL-15 humanizado comprende un gen que codifica IL-15 humanizada que está bajo el control de elementos reguladores no humanos endógenos. Los elementos reguladores no humanos endógenos pueden comprender todos los elementos reguladores endógenos de IL-15 corriente arriba (con respecto a la dirección transcripcional del gen de IL-15) de la primera región codificante de proteína o exón del gen de IL-15 humanizado. Los elementos reguladores no humanos endógenos pueden comprender todos los elementos reguladores endógenos de IL-15 corriente abajo (con respecto a la dirección transcripcional del gen de IL-15) de la última región codificante de proteína o exón en el gen de IL-15 humanizado. El gen que codifica IL-15 humanizada puede comprender una región 3'UTR humana.

Se describe un roedor modificado genéticamente que comprende una sustitución en un locus endógeno de IL-15 de roedor de una secuencia genómica endógena de IL-15 de roedor con una secuencia genómica de IL-15 humana. La modificación genética puede ser en la línea germinal del animal no humano.

El roedor modificado genéticamente puede comprender una primera secuencia reguladora de roedor corriente arriba (con respecto a la dirección de la transcripción del gen de IL-15) de la secuencia genómica de IL-15 humana y una segunda secuencia reguladora de roedor corriente abajo de la secuencia genómica de IL-15 humana. La primera secuencia reguladora de roedor puede comprender un promotor y/o un potenciador de roedor, y la segunda secuencia reguladora de roedor comprende una región 3'-UTR.

Se describe un animal no humano modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humana o humanizada.

Se describe un ratón modificado genéticamente que comprende una sustitución en un locus endógeno de IL-15 de ratón de una secuencia genómica endógena de IL-15 de ratón (o fragmento de esta) con una secuencia genómica de IL-15 humana (o fragmento de esta) para formar un locus modificado, en donde la secuencia genómica de IL-15 humana comprende al menos un exón codificante de la proteína humana.

La sustitución puede comprender un fragmento genómico humano que comprende al menos dos exones codificantes de la proteína IL-15 humana. La sustitución puede comprender un fragmento genómico humano que comprende al menos tres exones codificantes de la proteína IL-15 humana. La sustitución puede comprender un fragmento genómico humano que comprende al menos cuatro exones codificantes de la proteína IL-15 humana. La sustitución puede comprender un fragmento genómico humano que comprende los exones 3, 4, 5 y 6 codificantes de la proteína IL-15 humana. La sustitución puede comprender menos que todos los exones de IL-15 humana, en donde los exones humanos de la sustitución consisten en los cuatro exones codificantes de proteína del gen de IL-15 humano ubicados más corriente abajo (con respecto a la dirección de la transcripción del gen de IL-15). La sustitución puede consistir esencialmente en un fragmento genómico humano que contiene no más de cuatro exones codificantes de la proteína IL-15 humana. Además, la sustitución puede consistir esencialmente en una secuencia intrónica humana corriente arriba del exón humano más cercano al extremo 5' y una secuencia humana no codificante de proteína corriente abajo del codón de parada humano y corriente abajo de la región 3'UTR humana.

Se describe un ratón modificado genéticamente que comprende un locus de IL-15 humanizado, en donde el locus de IL-15 humanizado comprende exones de ratón no codificantes de proteína, en donde cada exón de ratón codificante de proteína (madura) se sustituye con exones humanos codificantes de proteína (madura). El locus de IL-15 humanizado puede comprender una sustitución de un fragmento genómico de ratón que codifica secuencias de la proteína IL-15 de ratón madura (es decir, no preproteína) con un fragmento genómico humano que codifica

secuencias de la proteína IL-15 humana madura (es decir, no preproteína).

Se describe un ratón modificado genéticamente que comprende una secuencia que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica, o es idéntica a la sec. con núm. de ident.:5.

5 Se describe un ratón modificado genéticamente que comprende una secuencia que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica, o es idéntica a la sec. con núm. de ident.:5; en donde el ratón carece de una secuencia endógena que codifica los exones 3 a 6 de una proteína IL-15 de ratón como se representa en la presente descripción, y el ratón comprende una secuencia de ácido nucleico en un locus endógeno de IL-15 de ratón en
10 donde la secuencia de ácido nucleico codifica los exones 3, 4, 5, y 6 de la IL-15 humana como se representa en la presente descripción.

15 Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humana o humanizada a partir de un locus endógeno de IL-15 de ratón que se modifica para comprender al menos un exón de IL-15 humana que codifica aminoácidos en una proteína IL-15 humana madura. En una modalidad, el locus endógeno de IL-15 de roedor comprende al menos dos exones de IL-15 humana que codifican aminoácidos en una proteína IL-15 humana madura. El locus endógeno de IL-15 de roedor puede comprender al menos tres exones de IL-15 humana que codifican aminoácidos en una proteína IL-15 humana madura. El locus endógeno de IL-15 de roedor puede comprender al menos cuatro exones de IL-15 humana que codifican aminoácidos en una proteína IL-15 humana madura. El roedor endógeno comprende los exones 3, 4, 5 y 6 de IL-15 humana que codifican aminoácidos en una
20 proteína IL-15 humana madura. El locus endógeno de IL-15 de roedor puede comprender toda la secuencia de ácido nucleico humana que codifica aminoácidos en una proteína IL-15 humana madura.

25 La humanización puede comprender una región 3'UTR de IL-15 humana. El locus de roedor puede comprender al menos un exón que no codifica aminoácidos de una proteína IL-15 madura o al menos un exón que incluye una secuencia de nucleótidos que no codifica aminoácidos de una proteína IL-15 madura. El locus de roedor puede comprender al menos dos exones que no codifican aminoácidos de una proteína IL-15 madura. El locus de roedor puede comprender al menos tres exones que no codifican aminoácidos de una proteína IL-15 madura. El locus de roedor puede comprender cuatro exones que no codifican aminoácidos de una proteína IL-15 madura.
30

Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humanizada, en donde la población de linfocitos del roedor se caracteriza por su población de células T que es aproximadamente igual en cantidad a una población de células T en un ratón silvestre de la misma edad. El roedor modificado puede caracterizarse por una población de células T maduras que es aproximadamente igual en cantidad a una población de células T maduras en un ratón silvestre de la misma edad.
35

Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humanizada, en donde la población de linfocitos del roedor se caracteriza por una población de células T que es aproximadamente igual en cantidad a una población de células T en un ratón silvestre de la misma edad. El roedor modificado puede exhibir una población de células T maduras que es aproximadamente igual en cantidad a una población de células T maduras en un ratón silvestre de la misma edad. El roedor modificado puede exhibir una población de células T periféricas que es aproximadamente igual en cantidad a la población de células T periféricas en un ratón silvestre de la misma edad. La proteína IL-15 humanizada madura puede ser idéntica a una proteína IL-15 humana madura.
40

45 Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humanizada, en donde la población de linfocitos del roedor se caracteriza por una población de células T que exhibe una relación CD4:CD8 que es aproximadamente igual a la relación CD4:CD8 en la población de células T de un ratón silvestre de la misma edad. La proteína IL-15 humanizada puede ser idéntica a una proteína IL-15 humana.

50 Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humanizada, en donde la población de linfocitos del roedor se caracteriza por una población de células asesinas naturales (NK) que es aproximadamente igual en tamaño a una población de células NK de un ratón silvestre de la misma edad. La proteína IL-15 humanizada puede ser idéntica a una proteína IL-15 humana.

55 Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humana o humanizada, en donde la población de linfocitos del roedor se caracteriza por una población de células T y una población de células NK que son cada una de ellas aproximadamente iguales en tamaño a una población de células T y a una población de células NK en un ratón silvestre de la misma edad.

60 Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humanizada, en donde el roedor no desarrolla inflamación intestinal espontánea. El roedor puede no mostrar una tendencia a desarrollar inflamación intestinal más que un roedor silvestre de la misma edad.

65 Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humanizada, en donde el roedor no desarrolla inflamación espontánea en la zona duodeno yeyunal. El roedor puede no mostrar una tendencia a desarrollar inflamación en la zona duodeno yeyunal más que un roedor silvestre de la misma edad.

Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humanizada, en donde el roedor no exhibe una destrucción del epitelio intestinal mayor que un roedor silvestre de la misma edad.

- 5 Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humanizada, en donde el roedor no exhibe enfermedad celíaca a una tasa o frecuencia mayor que un roedor silvestre de la misma edad.

Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humanizada, en donde el roedor no exhibe una mayor resistencia a la adiposidad inducida por la dieta, y no exhibe una mayor sensibilidad a la insulina, que un roedor silvestre de la misma edad.

- 10 Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humanizada, en donde tras la infección con un patógeno el roedor no es más susceptible a la lesión hepática letal inducida por lipopolisacáridos que un roedor silvestre de la misma edad.

- 15 Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humanizada, en donde el roedor no desarrolla lesiones psoriásicas a una tasa o frecuencia mayor que un roedor silvestre de la misma edad.

Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humanizada, en donde el roedor no desarrolla artritis a una tasa o frecuencia mayor que un roedor silvestre de la misma edad.

- 20 Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humanizada, en donde el roedor no desarrolla infiltración linfocitaria de las articulaciones a una tasa o frecuencia mayor que un roedor silvestre de la misma edad.

- 25 Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humanizada, en donde el roedor no desarrolla sinovitis inflamatoria a una tasa mayor que un roedor control silvestre de la misma edad.

Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humana o humanizada, en donde el roedor no desarrolla una o más patologías a una tasa o frecuencia mayor que la de un roedor silvestre de la misma edad, en donde la una o más patologías se seleccionan del grupo que consiste en artritis, infiltración linfocitaria de las articulaciones, sinovitis inflamatoria, lesiones psoriásicas, lesión hepática letal inducida por lipopolisacáridos asociada a patógenos, una resistencia a la insulina, una resistencia a la adiposidad inducida por la dieta, inflamación intestinal espontánea, inflamación espontánea en la zona duodeno yeyunal, destrucción del epitelio intestinal, enfermedad celíaca, y una combinación de estas.

- 30 Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humana o humanizada, en donde el roedor no desarrolla dos o más patologías a una tasa o frecuencia mayor que la de un roedor silvestre de la misma edad, en donde las dos o más patologías se seleccionan del grupo que consiste en artritis, infiltración linfocitaria de las articulaciones, sinovitis inflamatoria, lesiones psoriásicas, lesión hepática letal inducida por lipopolisacáridos asociada a patógenos, una resistencia a la insulina, una resistencia a la adiposidad inducida por la dieta, inflamación intestinal espontánea, inflamación espontánea en la zona duodeno yeyunal, destrucción del epitelio intestinal, y enfermedad celíaca.

- 45 Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humana o humanizada, en donde el roedor no desarrolla tres o más patologías a una tasa o frecuencia mayor que la de un roedor silvestre de la misma edad, en donde las tres o más patologías se seleccionan del grupo que consiste en artritis, infiltración linfocitaria de las articulaciones, sinovitis inflamatoria, lesiones psoriásicas, lesión hepática letal inducida por lipopolisacáridos asociada a patógenos, una resistencia a la insulina, una resistencia a la adiposidad inducida por la dieta, inflamación intestinal espontánea, inflamación espontánea en la zona duodeno yeyunal, destrucción del epitelio intestinal, y enfermedad celíaca.

- 50 Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humana o humanizada, en donde el roedor no desarrolla cuatro o más patologías a una tasa o frecuencia mayor que la de un roedor silvestre de la misma edad, en donde las cuatro o más patologías se seleccionan del grupo que consiste en artritis, infiltración linfocitaria de las articulaciones, sinovitis inflamatoria, lesiones psoriásicas, lesión hepática letal inducida por lipopolisacáridos asociada a patógenos, una resistencia a la insulina, una resistencia a la adiposidad inducida por la dieta, inflamación intestinal espontánea, inflamación espontánea en la zona duodeno yeyunal, destrucción del epitelio intestinal, y enfermedad celíaca.

- 60 Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humana o humanizada, en donde el roedor no desarrolla cinco o más patologías a una tasa o frecuencia mayor que la de un roedor silvestre de la misma edad, en donde las cinco o más patologías se seleccionan del grupo que consiste en artritis, infiltración linfocitaria de las articulaciones, sinovitis inflamatoria, lesiones psoriásicas, lesión hepática letal inducida por lipopolisacáridos asociada a patógenos, una resistencia a la insulina, una resistencia a la adiposidad inducida por la dieta, inflamación intestinal espontánea, inflamación espontánea en la zona duodeno yeyunal, destrucción del epitelio intestinal, y enfermedad celíaca.

- Se describe un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína IL-15 humana o humanizada, en donde el roedor no desarrolla seis o más patologías a una tasa o frecuencia mayor que la de un roedor silvestre de la misma edad, en donde las seis o más patologías se seleccionan del grupo que consiste en artritis, infiltración linfocitaria de las articulaciones, sinovitis inflamatoria, lesiones psoriásicas, lesión hepática letal inducida por lipopolisacáridos asociada a patógenos, una resistencia a la insulina, una resistencia a la adiposidad inducida por la dieta, inflamación intestinal espontánea, inflamación espontánea en la zona duodeno yeyunal, destrucción del epitelio intestinal, y enfermedad celíaca.
- Se describe un animal no humano modificado genéticamente que comprende una humanización de un locus endógeno de IL-15, en donde el animal expresa una proteína IL-15 madura parcialmente o completamente humana, y en donde la proteína IL-15 madura parcialmente o completamente humana se expresa a niveles comparables y en los mismos tejidos que una proteína IL-15 endógena en un animal silvestre de la misma edad.
- Se describe un vector de transformación grande (LTVEC) que comprende brazos de homología a un locus endógeno de IL-15 no humano, en donde el LTVEC comprende, dispuesto entre dichos brazos de homología, un fragmento genómico humano contiguo que comprende exones codificantes de proteína de un gen de IL-15 humano. El fragmento genómico humano contiguo puede no comprender exones no codificantes de proteína de un locus de IL-15 humano. El fragmento genómico humano contiguo puede comprender, además, una región 3'UTR humana de un gen de IL-15.
- Se describe un constructo de ácido nucleico (*por ejemplo*, ADN), que comprende de 5' a 3' con respecto a la dirección de la transcripción, una secuencia de ácido nucleico homóloga a una secuencia no codificante en 5' de IL-15 de ratón, un fragmento genómico humano que comprende exones codificantes de la proteína IL-15 humana pero que no comprende una secuencia reguladora humana corriente arriba con respecto a la secuencia que codifica la proteína IL-15 humana, y una secuencia de ácido nucleico homóloga a una secuencia no codificante en 3' de IL-15 de ratón. El fragmento genómico humano puede comprender, además, una región 3'UTR de IL-15 humana.
- Se describe un constructo de ácido nucleico (*por ejemplo*, ADN), que comprende de 5' a 3' con respecto a la dirección de la transcripción, una secuencia de ácido nucleico que comprende una región de homología a secuencias génicas de IL-15 de ratón corriente arriba del primer exón codificante de la proteína IL-15 de ratón, un fragmento genómico humano que codifica una proteína IL-15 humana pero que no comprende una secuencia reguladora humana corriente arriba de la secuencia que codifica la proteína IL-15 humana, y una secuencia de ácido nucleico homóloga a una secuencia no codificante en 3' de IL-15 de ratón. El fragmento genómico humano puede comprender, además, una región 3'UTR de IL-15 humana.
- Se describe una célula no humana modificada genéticamente, en donde la célula no humana comprende una sustitución en un locus endógeno de IL-15 no humano de una secuencia génica que codifica una IL-15 no humana con una secuencia genómica humana que codifica una IL-15 humana.
- La secuencia genómica humana puede comprender una secuencia de ácido nucleico humana contigua que abarca todos los exones codificantes de proteína del gen de IL-15 humano.
- El roedor modificado genéticamente puede comprender un promotor de IL-15 no humano en el locus endógeno de IL-15 no humano.
- El animal no humano modificado genéticamente puede comprender todos los exones no codificantes de proteína de roedor y las regiones reguladoras corriente arriba del primer exón codificante de proteína del gen de IL-15 de roedor.
- La célula puede seleccionarse de una célula pluripotente, una célula pluripotente inducida, una célula totipotente, una célula ES, una célula somática, y un óvulo.
- La célula puede expresar la proteína IL-15 humana.
- El animal no humano puede ser un mamífero. El mamífero puede ser un roedor. El roedor puede seleccionarse de un ratón y una rata.
- Se describe un embrión no humano, en donde el embrión comprende al menos una célula donante no humana (*por ejemplo*, una célula ES, una célula pluripotente, una célula totipotente, *etcétera*) que comprende una sustitución de una secuencia de ácido nucleico endógena que codifica IL-15 no humana con una secuencia de ácido nucleico que codifica IL-15 humana en un locus endógeno de IL-15 no humano. La célula donante puede ser una célula ES no humana y el embrión es un embrión de un animal no humano huésped que es una premórula, una mórula, o un blastocisto.
- El embrión no humano puede ser un embrión de rata, y la al menos una célula donante no humana es una célula de rata. La célula ES no humana puede ser una célula ES de rata y el embrión huésped es un embrión de rata.

El embrión no humano puede ser un embrión de ratón, y la al menos una célula donante no humana es una célula de ratón. La célula ES no humana puede ser una célula ES de ratón y el embrión huésped es un embrión de ratón.

5 Se describe un tejido de roedor que comprende un gen de IL-15 humanizado en un locus endógeno de IL-15 de roedor. El tejido puede seleccionarse de tejido epitelial, tejido de la piel, y tejido muscular.

10 Se describe un roedor modificado genéticamente que comprende una secuencia de ácido nucleico (*por ejemplo*, ADN) que codifica una proteína IL-15 humana, en donde el roedor no expresa una IL-15 de roedor, y en donde el roedor exhibe una población de células NK que es aproximadamente igual en tamaño a una población de células NK de un roedor silvestre. El roedor puede ser una rata. El roedor puede ser un ratón.

15 El roedor puede exhibir una población de células T periféricas que es aproximadamente igual en tamaño a una población de células T periféricas de un roedor silvestre de la misma edad.

20 Se describe un método para producir un animal no humano que expresa una proteína IL-15 humana o humanizada; el método comprende modificar genéticamente un animal no humano como se describe en la presente descripción para formar una secuencia de ácido nucleico en el animal no humano que comprende una secuencia de ácido nucleico (*por ejemplo*, ADN) que codifica una proteína IL-15 humana o humanizada, en donde la secuencia de ácido nucleico está bajo el control de elementos reguladores endógenos no humanos corriente arriba y corriente abajo.

25 El animal no humano puede modificarse genéticamente mediante la sustitución de una secuencia genómica de IL-15 endógena (o fragmento de esta), en un locus endógeno de IL-15, con una secuencia genómica de IL-15 humana (o fragmento de esta) para formar un locus modificado, en donde la secuencia genómica de IL-15 humana comprende al menos un exón codificante de la proteína humana. La sustitución puede comprender un fragmento genómico humano que comprende al menos dos exones codificantes de la proteína IL-15 humana. La sustitución puede comprender un fragmento genómico humano que comprende al menos tres exones codificantes de la proteína IL-15 humana. La sustitución puede comprender un fragmento genómico humano que comprende al menos cuatro exones codificantes de la proteína IL-15 humana. En una modalidad específica, la sustitución comprende un fragmento genómico humano que comprende los exones 3, 4, 5 y 6 codificantes de la proteína IL-15 humana. La sustitución puede comprender, además, una secuencia no codificante de proteína humana corriente abajo del codón de parada humano (*por ejemplo*, la región 3'UTR humana).

35 El animal no humano puede producirse a partir de una célula pluripotente o totipotente (*por ejemplo*, una célula ES). El animal no humano puede producirse mediante el empleo de una etapa de inyección nuclear en donde un constructo de ácido nucleico que comprende el gen de IL-15 humanizado (opcionalmente con secuencias reguladoras no humanas endógenas corriente arriba y/o corriente abajo) se introduce por inyección pronuclear. El constructo de ácido nucleico puede comprender un fragmento genómico humano que comprende los exones 3, 4, 5 y 6 codificantes de la proteína IL-15 humana. El constructo de ácido nucleico puede comprender, además, una secuencia no codificante de proteína humana corriente abajo del codón de parada humano (*por ejemplo*, la región 3'UTR humana). El animal no humano puede producirse mediante el empleo de un fibroblasto no humano modificado genéticamente con un gen de IL-15 humano o humanizado y (opcionalmente) elementos reguladores de IL-15 no humana corriente arriba y/o corriente abajo.

45 Se describe un método para identificar un agente que es un antagonista de la IL-15 humana; el método comprende una etapa de administrar un agente a un roedor modificado genéticamente como se describe en la presente descripción, determinar un efecto del agente sobre una función mediada por la IL-15 humana en el roedor, e identificar el agente como un antagonista de IL-15 si este antagoniza la función de la IL-15 humana en el roedor modificado genéticamente.

50 El agente puede comprender un dominio variable de inmunoglobulina que se une a IL-15. El agente puede unirse específicamente a la IL-15 humana pero no a la IL-15 de roedor. El agente puede ser un anticuerpo.

55 Se describe un método para determinar si un agente reduce el desarrollo linfocitario mediado por IL-15; el método comprende una etapa de administrar a un roedor modificado genéticamente como se describe en la presente descripción un antagonista de IL-15 durante un período de tiempo, medir la cantidad de linfocitos del roedor en uno o más puntos de tiempo después de la administración, y determinar si el antagonista de IL-15 reduce la población de linfocitos.

60 Se describe un método para determinar si un agente reduce la infiltración linfocitaria mediada por IL-15 de un tejido o una articulación; el método comprende una etapa de administrar a un roedor modificado genéticamente como se describe en la presente descripción un antagonista de IL-15 durante un período de tiempo, medir la infiltración linfocitaria del tejido o la articulación en uno o más puntos de tiempo después de la administración, y determinar si el antagonista de IL-15 reduce la infiltración linfocitaria del tejido o la articulación.

65 Se describe un método para determinar si un agente reduce la progresión de la artritis mediada por IL-15; el método

comprende una etapa de administrar a un roedor modificado genéticamente como se describe en la presente descripción, y que comprende, además, una artritis inducida, un antagonista de IL-15 durante un período de tiempo, medir la progresión de la artritis, y determinar si el antagonista de IL-15 afecta la progresión de la artritis en el roedor.

- 5 A menos que se indique de cualquier otra manera, o resulte evidente en el contexto, dos o más aspectos y/o modalidades pueden combinarse.

Breve descripción de las figuras

- 10 La Figura 1 representa (no a escala) un esquema de un locus génico de IL-15 de ratón silvestre (parte superior) y un locus endógeno humanizado de IL-15 de ratón (parte inferior). Los símbolos abiertos indican secuencia humana; los símbolos cerrados indican secuencia de ratón; los elementos punteados indican regiones no traducidas. Los exones no codificantes corriente arriba (a la izquierda en la figura) del gen de IL-15 de ratón no se muestran (y no se humanizaron). El constructo inferior representa una modalidad de un gen de IL-15 humanizado que comprende una
15 región 3'UTR humanizada (punteada) y un casete para la selección con fármacos extraíble, que se extrae, opcionalmente, en el animal humanizado.

- La Figura 2 es una secuencia de ácido nucleico (sec. con núm. de ident.:1) que representa la unión corriente arriba (con respecto a la dirección de la transcripción del gen de IL-15) entre la secuencia de ratón y la secuencia humana; la secuencia mostrada comienza con una secuencia de ratón en mayúsculas, seguida de un sitio de restricción AsisI en minúsculas, seguido de la secuencia de ácido nucleico de IL-15 humana en mayúsculas. Los puntos suspensivos indican que la secuencia continúa corriente arriba y corriente abajo de la secuencia mostrada.
20

- La Figura 3 es una modalidad de una secuencia de ácido nucleico (sec. con núm. de ident.:2) que indica la secuencia codificante y no codificante de IL-15 humana corriente abajo en mayúsculas (región 3'UTR humana subrayada), seguida de un sitio XhoI en minúsculas, seguido de un sitio lox (mayúsculas, subrayado), seguido de una secuencia del casete de selección con Neo corriente abajo (mayúsculas), que se extiende 2.6 kb corriente abajo.
25

- La Figura 4 es una secuencia de ácido nucleico (sec. con núm. de ident.:3) que representa la unión entre la porción corriente abajo del casete de selección con Neo (mayúsculas), con un sitio lox (mayúsculas y subrayado), seguido de un sitio NheI (minúsculas), al que le sigue la secuencia de ratón corriente abajo de la humanización (mayúsculas); el 2.6 kb indica que el casete de selección se extiende aún más corriente arriba; los puntos suspensivos indican que la secuencia continúa.
30

- La Figura 5 representa un alineamiento de las secuencias de proteína para la proteína precursora de IL-15 de ratón (parte superior, "mIL15_precursor", sec. con núm. de ident.:4); la proteína precursora de IL-15 de ratón/humana híbrida (parte media, "Regn_Hybrid_m/h", sec. con núm. de ident.:5) producida por una humanización del locus representado en la Figura 1; y la preproteína de la isoforma 1 de la IL-15 humana conocida (parte inferior, "hIL15 isoform 1", sec. con núm. de ident.:6); la unión resultante de la humanización como se representa en la Figura 1 se indica mediante una flecha vertical que indica a C como el primer aminoácido de la sustitución; el inicio de la proteína IL-15h madura se indica mediante la flecha curvada en el primer aminoácido N.
35 40

- La Figura 6 representa la IL-15 detectada en suero de ratones heterocigotos para IL-15h inyectados con poli I:C. El control indica que no se detectó IL-15h en esplenocitos cultivados a partir de ratones silvestres inyectados con poli I:C.
45

- La Figura 7 representa que la IL-15 humana no reacciona con la IL-15 de ratón o poli I:C en un ensayo ELISA. La IL-15 de ratón estaba a 1000 pg/ml.
50

- La Figura 8 representa BM-DC de ratones heterocigotos para IL-15 humana, con el uso de sobrenadantes de BM-DC concentrados 7 veces para ratones no tratados, ratones tratados con poli I:C, y ratones tratados con LPS.

- La Figura 9 representa que las BM-DC de ratones heterocigotos para IL-15 humana producen el transcrito de IL-15 humana (datos de RT-PCR). Carril 1: ratones no tratados; Carril 2: ratones tratados con poli I:C; Carril 3: LPS solo; Carril 4: ratones silvestres no tratados; Carril 5: ratones silvestres tratados con poli I:C; Carril 6: ratones silvestres tratados con LPS; Carril 7: control sin ADNc (agua sola).
55

- La Figura 10 representa que los ratones MAID 5218 heterocigotos produjeron IL-15 humana tras la inyección de poli I:C a un nivel comparable al de los ratones MAID 5217 heterocigotos.
60

Descripción detallada

- Se describen organismos no humanos modificados genéticamente que comprenden un locus endógeno de IL-15 modificado que comprende una secuencia humana, *por ejemplo*, una sustitución de una o más secuencias no humanas con una o más secuencias humanas. Generalmente, los organismos son capaces de transferir la
65

modificación a la progenie, es *decir*, a través de la transmisión de la línea germinal. Particularmente, se describen animales no humanos modificados genéticamente.

El animal no humano modificado genéticamente puede seleccionarse de un grupo que consiste en un ratón, rata, conejo, cerdo, bovino (*por ejemplo*, vaca, toro, búfalo), ciervo, oveja, cabra, pollo, gato, perro, hurón, primates (*por ejemplo*, tití, mono rhesus). Para los animales no humanos donde las células ES modificables genéticamente no están disponibles fácilmente, se emplean otros métodos para producir un animal no humano que comprende la modificación genética. Tales métodos incluyen, *por ejemplo*, modificar el genoma de una célula que no es ES (*por ejemplo*, un fibroblasto o una célula pluripotente inducida) y emplear la transferencia nuclear para transferir el genoma modificado a una célula adecuada, *por ejemplo*, un ovocito, y gestar la célula modificada (*por ejemplo*, el ovocito modificado) en un animal no humano en condiciones adecuadas para formar un embrión.

El animal no humano puede ser un mamífero. El animal no humano puede ser un mamífero pequeño, *por ejemplo*, de la superfamilia *Dipodoidea* o *Muroidea*. En una modalidad, el animal modificado genéticamente es un roedor. El roedor puede seleccionarse de un ratón, una rata, y un hámster. El roedor puede seleccionarse de la superfamilia *Muroidea*. El animal modificado genéticamente puede ser de una familia seleccionada de *Calomyscidae* (*por ejemplo*, hámsteres similares a ratón), *Cricetidae* (*por ejemplo*, hámster, ratas y ratones del Nuevo Mundo, ratones campestres), *Muridae* (ratones y ratas verdaderos, jerbos, ratones espinosos, ratas crestadas), *Nesomyidae* (ratones trepadores, ratones de roca, ratas coliblancas, ratas y ratones de Madagascar), *Platacanthomyidae* (*por ejemplo*, lirones espinosos), y *Spalacidae* (*por ejemplo*, ratas topo, ratas de bambú, y zokor). El roedor modificado genéticamente puede seleccionarse de un ratón o una rata verdaderos (familia *Muridae*), un jerbo, un ratón espinoso, y una rata crestada. El ratón modificado genéticamente puede ser de un miembro de la familia *Muridae*. El animal puede ser un roedor. El roedor puede seleccionarse de un ratón y una rata. El animal no humano puede ser un ratón.

En una modalidad específica, el ratón es de una cepa C57BL seleccionada de C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, y C57BL/Ola. En otra modalidad, el ratón es una cepa 129 seleccionada del grupo que consiste en una cepa que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (*por ejemplo*, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (ver, *por ejemplo*, Festing y otros (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836, ver además, Auerbach y otros (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines). En una modalidad específica, el ratón modificado genéticamente es una mezcla de una cepa 129 mencionada anteriormente y una cepa C57BL/6 mencionada anteriormente. En otra modalidad específica, el ratón es una mezcla de cepas 129 mencionadas anteriormente, o una mezcla de cepas BL/6 mencionadas anteriormente. En una modalidad específica, la cepa 129 de la mezcla es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En otra modalidad, el ratón es una cepa BALB, *por ejemplo*, la cepa BALB/c. Aún en otra modalidad, el ratón es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa mencionada anteriormente. Aún en otra modalidad, el ratón es de una línea híbrida (*por ejemplo*, 50 % BALB/c - 50 % 129S4/Sv; o 50 % C57BL/6 - 50 % 129; *por ejemplo*, células F1H4, ver, *por ejemplo*, Auerbach y otros (2000)).

El animal no humano puede ser una rata. La rata puede seleccionarse de una rata Wistar, una cepa LEA, una cepa Sprague Dawley, una cepa Fischer, F344, F6, y Dark Agouti. La cepa de rata puede ser una mezcla de dos o más cepas seleccionadas del grupo que consiste en Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6, y Dark Agouti.

El animal no humano puede tener una o más de otras modificaciones genéticas, y/u otras modificaciones, que son adecuadas para el propósito particular para el que se produce el ratón con IL-15 humanizada. Por ejemplo, los ratones adecuados para mantener un xenoinjerto (*por ejemplo*, un cáncer o tumor humano), pueden comprender una o más modificaciones que comprometen, inactivan, o destruyen completamente o en parte el sistema inmunológico del animal no humano. El compromiso, la inactivación, o la destrucción del sistema inmunológico del animal no humano pueden incluir, *por ejemplo*, la destrucción de células hematopoyéticas y/o células inmunológicas por medios químicos (*por ejemplo*, administración de una toxina), medios físicos (*por ejemplo*, irradiación del animal), y/o modificación genética (*por ejemplo*, desactivación de uno o más genes). Los ejemplos no limitantes de tales ratones pueden incluir, *por ejemplo*, ratones NOD, ratones SCID, ratones NON/SCID, ratones con desactivación de IL2R γ , ratones NOD/SCID/ γ ^{nu/nu} (ver, *por ejemplo*, Ito, M. y otros (2002) NOD/SCID/ γ ^{nu/nu} mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells, Blood 100(9):3175-3182), ratones desnudos, y ratones con desactivación de *Rag1* y/o *Rag2*. Opcionalmente, estos ratones pueden irradiarse, o tratarse de cualquier otra manera para destruir uno o más tipos de células inmunológicas. Por lo tanto, se describe un ratón modificado genéticamente que comprende una humanización de al menos una porción de un locus endógeno de IL-15 no humano, y que comprende, además, una modificación que compromete, inactiva, o destruye completamente o en parte, el sistema inmunológico (o uno o más tipos de células del sistema inmunológico) del animal no humano. La modificación se selecciona, *por ejemplo*, del grupo que consiste en una modificación que da como resultado un ratón NOD, un ratón SCID, un ratón NOD/SCID, un ratón con desactivación de IL-2R γ , un ratón NOD/SCID/ γ ^{nu/nu}, un ratón desnudo, un ratón con desactivación de *Rag1* y/o *Rag2*, y una combinación de estos. El ratón puede comprender una sustitución de toda la secuencia codificante de IL-15 madura con una secuencia codificante de IL-15 madura humana.

El ratón puede comprender una sustitución de toda la secuencia codificante de IL-15 madura con una secuencia codificante de IL-15 madura humana, y el ratón es un ratón NOD. El ratón puede comprender una sustitución de toda la secuencia codificante de IL-15 madura con una secuencia codificante de IL-15 madura humana, y el ratón es un ratón SCID. El ratón puede comprender una sustitución de toda la secuencia codificante de IL-15 madura con una secuencia codificante de IL-15 madura humana, y el ratón es un ratón NOD/SCID. El ratón puede comprender una sustitución de toda la secuencia codificante de IL-15 madura con una secuencia codificante de IL-15 madura humana, y el ratón comprende una desactivación de IL-2R γ . El ratón puede comprender una sustitución de toda la secuencia codificante de IL-15 madura con una secuencia codificante de IL-15 madura humana, y el ratón es un ratón NOD/SCID/ γ c^{nulo}. El ratón puede comprender una sustitución de toda la secuencia codificante de IL-15 madura con una secuencia codificante de IL-15 madura humana, y el ratón es un ratón desnudo. El ratón puede comprender una sustitución de toda la secuencia codificante de IL-15 madura con una secuencia codificante de IL-15 madura humana, y el ratón comprende una desactivación de *Rag1* y/o *Rag2*.

Se describen animales no humanos modificados genéticamente que comprenden una modificación de un locus endógeno de IL-15 no humano, en donde la modificación comprende una secuencia de ácido nucleico humana que codifica al menos una porción de una proteína IL-15 madura. Aunque también se describen células modificadas genéticamente que comprenden las modificaciones descritas en la presente descripción (por ejemplo, células ES, células somáticas), los animales no humanos modificados genéticamente pueden comprender la modificación del locus endógeno de IL-15 en la línea germinal del animal.

Se describen animales no humanos modificados genéticamente que comprenden una sustitución de una secuencia génica de IL-15 no humana con una secuencia génica de IL-15 humana. Un locus endógeno de IL-15 no humano puede modificarse completamente o en parte para comprender una secuencia de ácido nucleico humana que codifica al menos un exón codificante de proteína de una proteína IL-15 madura. La secuencia humana puede ser una secuencia genómica humana, *por ejemplo*, una secuencia genómica humana contigua que comprende uno o más exones que codifican una porción de una proteína IL-15 madura, o, *por ejemplo*, un ADNc que codifica al menos uno o más exones que codifican una porción de una proteína IL-15 madura. Todos los exones codificantes de la proteína IL-15 que codifican secuencias proteicas que aparecen en una proteína IL-15 humana madura pueden humanizarse. El locus de IL-15 humanizado puede estar bajo el control de secuencias reguladoras endógenas corriente arriba (por ejemplo, todas las secuencias endógenas corriente arriba de la humanización). La humanización puede comprender una región 3'UTR humana.

Los animales no humanos pueden ser mamíferos. Los mamíferos pueden ser roedores. Se describen roedores que comprenden una humanización de un gen de IL-15, en un locus endógeno de IL-15 de roedor. Se describen métodos para producir roedores, por ejemplo, ratones, que comprenden una sustitución de un gen endógeno de IL-15 o un fragmento de este (por ejemplo, un fragmento que comprende uno o más exones) con un gen de IL-15 humanizado, o un fragmento de este (por ejemplo, un fragmento que comprende uno o más exones), en el locus endógeno de IL-15. Se describen células, tejidos, y ratones que comprenden el gen humanizado, así como células, tejidos, y ratones que expresan IL-15 humana a partir de un locus endógeno de IL-15 no humano. Se describen, además, roedores que expresan una proteína IL-15 humana bajo el control de un promotor endógeno de roedor.

La IL-15 se descubrió como un factor de crecimiento de células T independiente de IL-2 que estimula la proliferación de células T y apoya el desarrollo del timo y el desarrollo de células asesinas naturales (NK) (Burton, J.D. y otros (1994) A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4935-4939; Grabstein, K.H. y otros (1994) Cloning of a T Cell Growth Factor That Interacts with the β Chain of the Interleukin-2 Receptor, Science 264:965-968). IL-2 e IL-15 comparten subunidades de los receptores. Sin embargo, la importancia independiente de la IL-15 en el mantenimiento de las poblaciones de células inmunológicas es indiscutible; los ratones con desactivación de IL-15/IL-15R exhiben pocas células T CD8+, pocas células T CD8+ de memoria, y pocas células NK, así como otros tipos de células (revisado en Steel, J.C. y otros (2012) Interleukin-15 biology and therapeutic implications in cancer, Trends in Pharmacological Sciences, 33(1):35-41).

Se conoce que la IL-15 se expresa en células endoteliales; la IL-15 derivada de células endoteliales estimula la migración transendotelial de células T (ver, Oppenheimer-Marks, N. (1998) Interleukin 15 is Produced by Endothelial Cells and Increases the Transendothelial Migration of T Cells in Vitro and in the SCID Mouse-Human Rheumatoid Arthritis Model In Vivo, J. Clin. Invest. 101 (6):1261-1272). Por lo tanto, los primeros trabajos establecieron una probabilidad de que el reclutamiento de células T a los sitios de inflamación esté mediado por IL-15 (*id.*). Este hecho es significativo, debido a que la expresión desmedida o inadecuada de IL-15 puede conducir fácilmente a un fenotipo patológico - una situación que se aborda con animales no humanos transgénicos que expresan IL-15 desregulada. La regulación adecuada de IL-15 es importante, debido a que se considera que la IL-15 es una citocina proinflamatoria que se encuentra en el vértice de una cascada de citocinas proinflamatorias, que precede a la expresión de muchos mediadores de la inflamación (McInnes, I.B. y otros (1997) Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- α production in rheumatoid arthritis, Nature Med. 3:189-195, citado en Waldmann, T.A. (2006) The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design, Nature Rev. Immunol. 6:595-601).

Los ratones transgénicos que expresan IL-15 humana bajo el control de un promotor específico de enterocitos (promotor T3b) para expresar IL-15 humana en células del epitelio intestinal desarrollan inflamación espontánea en la zona duodeno yeyunal (Yokoyama, S. y otros (2008) Antibody-mediated blockade of IL-15 reverses the autoimmune intestinal damage in transgenic mice that overexpress IL-15 in enterocytes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106(37):15849-15854; Ohta, N. y otros (2002) IL-15-dependent activation-induced cell death-resistant Th1 type CD8 alpha beta + NK1.1+ T cells for the development of small intestinal inflammation, J. Immunol. 169:460-468). Ver, además, Nishimura, H. y otros (2005) A novel autoregulatory mechanism for transcriptional activation of the IL-15 gene by nonsecretable isoform of IL-15 generated by alternative splicing, FASEB J. 19:19-28 (ratones transgénicos con una variante del gen de IL-15m insertada aleatoriamente).

Se han preparado ratones transgénicos para una isoforma secretable de IL-15 bajo el control de un promotor de MHC clase I, pero estos sobreexpresan IL-15 (Yajima, T. y otros (2001) Memory phenotype CD8(+) T cells in IL-15 transgenic mice are involved in early protection against a primary infection with *Listeria monocytogenes*, Eur.J. Immunol. 31(3):757-766). La sobreexpresión de IL-15 se correlaciona con la destrucción del epitelio intestinal por linfocitos T citotóxicos activados por IL-15 en la enfermedad celíaca (Yokoyama, S. y otros (2011) Transgenic Mice that Overexpress Human IL-15 in Enterocytes Recapitulate Both B and T Cell-Mediated Pathologic Manifestations of Celiac Disease, J. Clin. Immunol. 31:1038-1044), presumiblemente debido a la estimulación de la proliferación de células T CD8+ dirigidas a enterocitos a través de un proceso mediado por NKG2D (asesina natural grupo 2, miembro D) que incluye receptores cognados tales como MICA/B (*Id.*, en 1039). Parece claro hasta el momento que la expresión local de IL-15 provoca daño tisular mediado por células T en el intestino en la enfermedad celíaca (*Id.*).

Al menos un estudio de ratones transgénicos diseñados para sobreexpresar IL-15 en tejido muscular y en la circulación (con el empleo de un promotor de músculo esquelético) establece que la sobreexpresión de IL-15 afecta el metabolismo; tales ratones parecen emplear IL-15 como una mioquina que reduce la grasa corporal y proporciona resistencia a la adiposidad inducida por la dieta (Quinn, L.S. y otros (2009) Oversecretion of interleukin-15 from skeletal muscle reduces adiposity, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 296:E191-E202).

Se considera que la IL-15 también está implicada en la artritis reumatoide, quizás a través de una infiltración anormal de células T de las articulaciones (revisado en, *por ejemplo*, Fehninger T.A. y Caligiuri, M.A. (2001) Interleukin 15: biology and relevance to human disease, Blood 97(1):14-32). Los pacientes con sarcoidosis producen, además, macrófagos alveolares que expresan IL-15, los que pueden mediar la proliferación de células T en los pulmones (*Id.*, en 23). La IL-15 puede mediar, además, el rechazo de órganos en aloinjertos por medio de la proliferación de células T (*Id.*, en 24). La IL-15 puede estar implicada, además, en la leucemia de células T del adulto (*por ejemplo*, mediada por HTLV-1), en base al menos en parte a la activación de rutas mediadas por IL-15 en pacientes con leucemia de células T del adulto (*Id.*). El trabajo *in vitro* sugiere que la IL-15 activa la replicación del HIV, que también puede ser el caso en humanos (*Id.*, en 25).

En ratones transgénicos que expresan IL-15 dirigida por un promotor de MHC clase I, infectados con el bacilo *Mycobacterium bovis* de Calmette-Guérin, la sobreproducción de IL-15 hizo a los ratones susceptibles a una lesión hepática letal inducida por LPS, un efecto que no se observó cuando se redujeron las células T CD8+ en los ratones (Yajima, T. (2004) Overexpression of Interleukin-15 Increases Susceptibility to Lipopolysaccharide-Induced Liver Injury in Mice Primed with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin, Infection and Immunity 72(7):3855-3862), lo que sugiere un efecto mediado por la sobreproducción de IL-15.

Los ratones transgénicos que expresan IL-15 dirigida por un promotor de músculo esquelético exhibieron una mayor sensibilidad a la insulina y una resistencia a la obesidad inducida por la dieta, con estimulación aparente del metabolismo de ácidos grasos (Quinn, L.S. y otros (2011) Overexpression of interleukin-15 in mice promotes resistance to diet-induced obesity, increased insulin sensitivity, and markers of oxidative skeletal muscle metabolism, International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research, 3:29-42).

Se ha estudiado el bloqueo selectivo de la IL-15 murina, que incluye un IL-15R α soluble, que puede ser de beneficio clínico en el control de la artritis reumatoide (*Id.*, en 27). Por lo tanto, los animales no humanos que expresan IL-15 humana o humanizada, que incluye la expresión de una manera relevante fisiológicamente, son útiles para evaluar o identificar bloqueadores selectivos de la IL-15 humana. De acuerdo con un revisor, "el desarrollo de agentes bloqueadores de IL-15 humana eficaces ... con actividad de bloqueo *in vivo* podría facilitar la traducción rápida de estos enfoques a la clínica" (*Id.*, en 27). Por lo tanto, los animales no humanos modificados genéticamente, *por ejemplo*, animales no humanos que comprenden un gen de IL-15 humano en su línea germinal, en donde los animales no humanos expresan IL-15 humana de una manera fisiológicamente adecuada, serían muy útiles.

La IL-15 es una citocina pleiotrópica necesaria para el desarrollo y función de células NK y la homeostasis de células T. Es particularmente importante para el compartimiento de las células T CD8+ de memoria. La IL-15 se produce principalmente en células dendríticas y macrófagos, y se transpresenta por medio del complejo IL-15/IL-15R a las células NK y células T. Se conoce que la IL-15 es, además, una citocina proinflamatoria que induce la producción de otras citocinas, recluta y activa células T y otras células inflamatorias, promueve el desarrollo y la supervivencia de células NK, y promueve la angiogénesis; y muchas de estas características se muestran en las lesiones psoriásicas (revisado e informado en Villadsen, L.S. (2003) Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a

xenograft mouse model, J. Clin. Invest. 112(10):1571-1580). Se ha propuesto que la IL-15 es el vértice de la cascada de citocinas proinflamatorias, con diversas estrategias en marcha para modular la señalización de IL-15 para el tratamiento de enfermedades (revisado en Waldman (2006) The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design, Nature Reviews Immunology, 6:595-601). En un modelo de xenoinjerto de ratón de psoriasis en ratones SCID, el bloqueo de IL-15 con el uso de un anticuerpo para IL-15R (o IL-15) dio como resultado la reducción de la gravedad de la psoriasis (*Id.*). Por lo tanto, los animales no humanos que expresan IL-15 de una manera relevante fisiológicamente son útiles (*por ejemplo*, tienen una utilidad bien establecida) en modelos para enfermedades humanas, que incluyen pero no se limitan a modelos en ratones inmunocomprometidos, tales como, *por ejemplo*, ratones SCID y otros ratones inmunocomprometidos. Por lo tanto, se describe un roedor (*por ejemplo*, un ratón) que comprende un gen de IL-15 humano o humanizado bajo el control de elementos reguladores no humanos endógenos (*por ejemplo*, una humanización del gen que codifica IL-15 en un roedor, *por ejemplo*, un ratón).

El gen de IL-15 se encuentra en el cromosoma 4q31 humano y en el cromosoma 8 de ratón. El gen humano contiene 8 exones (7 codificantes), y parece existir en dos isoformas tanto en humanos como en ratones (ver, *por ejemplo*, Fehninger T.A. y Caligiuri, M.A. (2001) Interleukin 15: biology and relevance to human disease, Blood 97(1):14-32). El ARNm de IL-15 se produce en una amplia variedad de tejidos y tipos de células, y la regulación del gen de IL-15 en humanos parece estar regulada negativamente por una región corriente arriba cuya delección da como resultado un aumento drástico de la actividad del promotor de IL-15 (*Id.*, en 17). Los ratones transgénicos que carecen de control postranscripcional de IL-15 exhiben una leucemia linfocítica fatal (*Id.*). La regulación de la expresión de IL-15 parece ser muy estricta, mediada al menos por tripletes AUG en la región no traducida en 5', elementos reguladores en 3', y un sitio regulador putativo en la región C terminal (revisado en McInnes, I.B. y Gracie, J.A. (2004) Interleukin-15: a new cytokine target for the treatment of inflammatory diseases, Current Opinion in Pharmacology 4:392-397). El gen de IL-15 humano tiene nueve exones y ocho intrones, lo que incluye un exón 4a que está presente en humanos pero no en ratones, aunque la proteína IL-15 madura sólo se codifica en los exones 5 al 8 (revisado en Budagian, V. y otros (2006) IL-15/IL-15 receptor biology: A guided tour through an expanding universe, Cytokine & Growth Factor Reviews 17:259-280). Existen dos productos de ARNm por corte y empalme alternativo que producen dos isoformas de IL-15, que sólo se diferencian en la longitud del péptido señal, lo que es válido tanto para la proteína de ratón como para la humana (ver, *por ejemplo*, *Id.*). La Figura 1, que representa una estrategia de humanización para un locus de IL-15 de ratón, omite las secuencias de ratón corriente arriba que no se humanizaron (que incluyen exones que no aparecen en la proteína madura) para la simplicidad, y presenta una modificación de la enumeración de los exones relevantes para la humanización mostrada.

La IL-15 se expresa en muchos tipos de células y tejidos, que incluyen monocitos, macrófagos, células dendríticas, queratinocitos, células epidérmicas, fibroblastos, y células epiteliales de nervio, riñón, placenta, pulmón, corazón, y músculo (Grabstein, K.H. y otros (1994) Cloning of a T Cell Growth Factor That Interacts with the β Chain of the Interleukin-2 receptor, Science 264:965-968).

Las secuencias codificantes de IL-15 de ratón se humanizaron como se representa en la Figura 1, que omite la representación de dos exones no codificantes (que no se humanizaron) que se encuentran alejados corriente arriba de los exones codificantes. 12299 nucleótidos de la secuencia de ratón se sustituyeron con 12896 nucleótidos de la secuencia humana para humanizar el gen de IL-15.

El locus de IL-15 humanizado puede carecer de una región 5'UTR de IL-15 humana. El locus de IL-15 humanizado puede comprender una región 5'UTR de roedor. El roedor puede ser un ratón, y el locus de IL-15 humanizado comprende una región 5'UTR de IL-15 de ratón.

Los roedores que expresan una proteína IL-15 humana o humanizada, *por ejemplo*, de una manera fisiológicamente adecuada, proporcionan una variedad de usos que incluyen, pero no se limitan a, el desarrollo de agentes terapéuticos para enfermedades y trastornos humanos. Los antagonistas de IL-15, tales como, *por ejemplo*, formas solubles del receptor de IL-15, pueden prevenir el desarrollo de artritis mediada por colágeno en un modelo animal (ver, Ruchatz, H. y otros, (1998) Soluble IL-15 receptor α -chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: a role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology, J. Immunol. 160:5654-5660); anticuerpos anti-IL-15 han exhibido eficacia contra una variedad de enfermedades, que incluyen psoriasis y artritis reumatoide; en un modelo animal de artritis, un antagonista del receptor de IL-15 previene el desarrollo y la progresión de la artritis, así como reduce la infiltración linfocitaria de las articulaciones (Ferrari-Lacraz, S. y otros (2004) Targeting IL-15 Receptor-Bearing Cells with an Antagonist Mutant IL-15/Fc Protein Prevents Disease Development and Progression in Murine Collagen-Induced Arthritis, J. Immunol. 173:5815-5826); la señalización mediada por IL-15 también se ha implicado en IBD, SLE, sinovitis inflamatoria, diabetes mellitus, y asma (revisado en Budagian, V. y otros (2006) IL-15/IL-15 receptor biology: A guided tour through an expanding universe, Cytokine & Growth Factor Reviews 17:259-280).

Estudios con ratones con desactivación de IL-15 establecen que la IL-15 es necesaria para el desarrollo de ciertas células inmunológicas, particularmente, las células NK (revisado en Lodolce, J.P. (2002) Regulation of lymphoid homeostasis by interleukin-15, Cytokine & Growth Factor Reviews, 13:429-439). De hecho, los ratones con desactivación de IL-15 no sobreviven mucho tiempo a la exposición a ciertos patógenos (*por ejemplo*, virus

Vaccinia), presumiblemente debido a la carencia de células NK y T CD8+ (*Id.*). Por lo tanto, los efectos de los antagonistas de IL-15h sobre la función de las células NK humanas representan una aplicación importante de un animal con IL-15 humanizada.

Se describen animales modificados genéticamente que expresan IL-15 humana o humanizada, que son útiles para la evaluación de antagonistas de la IL-15 humana. Los animales modificados genéticamente pueden comprender, además, un modelo animal de una enfermedad humana, *por ejemplo*, la enfermedad se induce genéticamente (una activación o desactivación) o de cualquier otra manera. Los animales no humanos modificados genéticamente pueden comprender, además, un sistema inmunológico dañado, *por ejemplo*, un animal no humano modificado genéticamente para sostener o mantener un xenoinjerto humano, *por ejemplo*, un tumor sólido o un tumor de células de la sangre humano (*por ejemplo*, un tumor linfocitario, *por ejemplo*, un tumor de células B o T).

Ejemplos

Ejemplo 1: Humanización del locus de IL-15 de ratón

Se modificaron células ES de ratón para sustituir ciertas secuencias del gen de IL-15 de ratón con ciertas secuencias del gen de IL-15 humano en el locus endógeno de IL-15 de ratón, bajo el control de elementos reguladores de IL-15 de ratón, con el uso de una tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE®, para producir un locus humanizado como se muestra en la Figura 1. La Figura 1 no muestra corriente arriba (con respecto a la dirección de la transcripción del gen de IL-15) los exones 5' no traducidos del gen de ratón; el Ex1 de la Figura 1 muestra una pequeña región no traducida (vacía) corriente arriba del exón codificante. Como se muestra, en la humanización en la parte inferior de la Figura 1, los exones codificantes 1 y 2 de ratón se conservaron, mientras que los exones codificantes 3 a 6 de ratón se sustituyeron con los exones 3 a 6 humanos. En el extremo corriente abajo, el exón 6 humano va seguido de un codón de parada y una región 3'-UTR humana y, además, de una secuencia humana que se encuentra corriente abajo de la región 3'-UTR humana. Con propósitos de selección, se incluyó un casete de selección (con flox para su extracción con Cre). El locus humanizado de la Figura 1 expresa una proteína IL-15 madura que es completamente humana.

Construcción de transformación. La recombinación homóloga en bacterias (BHR) se realiza para construir un vector de transformación grande (LTVEC) que contiene secuencias del gen de IL-15 humano para dirigirlos al locus de IL-15 de ratón con el uso de técnicas de BHR estándar (ver, *por ejemplo*, Valenzuela y otros (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659) y BHR por reparación de brechas. Los fragmentos lineales se generan mediante la ligación de cajas de homología generadas por PCR a casetes clonados seguido del aislamiento en gel de los productos de ligación y su electroporación en bacterias competentes para BHR que albergan el cromosoma artificial bacteriano (BAC) objetivo. El BAC PRC123-203P7 de ratón se usa como la fuente de secuencia de ratón; el BAC RP11-103B12 humano se usa como la fuente de secuencia del gen de IL-15 humano. Después de una etapa de selección, los clones recombinados correctamente se identifican por PCR de las nuevas uniones, y por análisis de restricción. Se preparó un vector de transformación grande (LTVEC) que contiene brazos de homología y secuencias del gen de IL-15 humano. Células ES de ratón se sometieron a electroporación con los constructos LTVEC, se cultivaron en medio de selección, y se usaron como células ES donantes para producir ratones con IL-15 humanizada que comprenden una sustitución en el locus endógeno de IL-15 de ratón con una secuencia humana como se representa en la Figura 1.

El gen de IL-15 de ratón (número de identificación del gen de ratón: 103014; RefSeq del transcrito: NM_008357.2; eID de ensemble:16168) se modifica mediante el uso de las coordenadas genómicas para la delección GRCh38: ch 8: 82331173-82343471 (cadena no codificante); coordenadas genómicas para la sustitución GRCh37: ch4: 142642924-142655819 (cadena codificante). 12299 nucleótidos de la secuencia de ratón se sustituyeron por 128996 nucleótidos de la secuencia humana. La sustitución de la secuencia de IL-15 de ratón como se describió anteriormente se representa gráficamente en la Figura 1.

El LTVEC que comprende el gen de IL-15 humanizado tenía aproximadamente 13 kb del brazo de transformación de ratón corriente arriba flanqueado corriente arriba con un sitio MluI, y un brazo de transformación de ratón de 27 kb corriente abajo flanqueado corriente abajo con un sitio AscI. El LTVEC se linealizó con las enzimas MluI y AscI para su electroporación.

Después de la construcción del LTVEC, la secuencia de nucleótidos del LTVEC a través de la unión ratón/humano en 5', y la unión humano/ratón en 3' es como se muestra en las Figuras 2-4.

Después de la electroporación de la célula ES, se realiza un ensayo de pérdida del alelo nativo (ver, *por ejemplo*, Valenzuela y otros (2003)) para detectar la pérdida de la secuencia endógena de IL-15 debido a la transformación.

Las células ES transformadas correctamente (MAID 5217) se sometieron, posteriormente, a electroporación con un vector para la expresión transitoria de Cre para extraer el casete para la selección con el fármaco Neo. Las células ES resultantes sin el casete se nombraron MAID 5218.

Ejemplo 2: Ratones con IL-15 humanizada

Generación de ratones con IL-15 humanizada. Las células ES donantes de ratón que comprenden un locus de IL-15 humanizado (por ejemplo, MAID 5217 o MAID 5218) se introducen en embriones de ratón en etapa temprana mediante el método VELOCIMOUSE® (Poueymirou y otros. (2007) F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses, *Nat Biotechnol* 25:91-99). Se obtienen ratones heterocigotos, y para obtener homocigotos con respecto a la IL-15 humanizada, los heterocigotos se cruzan.

Ejemplo 3: Fenotipificación de ratones con IL-15 humanizada

Ratones. Los ratones eran hembras Balb/c silvestres (WT) de 8-10 semanas de edad o hembras MAID 5217 (heterocigotas para el gen de IL-15 humano) de la misma edad. Alternativamente, los ratones eran ratones silvestres (WT) o ratones MAID 5217 o MAID 5218 de la misma edad (ambos heterocigotos para el gen de IL-15 humano).

Inyección de poli I:C in vivo. Los ratones Balb/c WT o MAID 5217 heterocigotos se inyectaron con 50 µg de poli I:C (Invivogen; Cat #tlrl-pic) por medio de la vena de la cola (inyección IV). Después de 24 horas, los ratones se sacrificaron y la sangre se extrajo por medio de una punción cardíaca y el suero se aisló. Además, se cosecharon los bazo y los esplenocitos se prepararon mediante la ruptura mecánica de los bazo a través de un filtro de malla de 70 µm seguido de tratamiento con tampón de lisis ACK (Invitrogen) para lisar los glóbulos rojos (RBC). Los esplenocitos aislados se cultivaron para su estimulación adicional (ver más abajo). El suero se analizó para detectar la IL-15 humana con el uso del estuche de IL-15 humana QUANTIKINE™ de R&D Systems. Los ratones WT o MAID 5218 heterocigotos se inyectaron con 50 µg de poli I:C (Invivogen; Cat #tlrl-pic) por vía IP. La sangre de los ratones se extrajo al día siguiente por medio de una punción cardíaca y el suero se analizó para detectar la IL-15 humana por ELISA (estuche de ELISA QUANTIKINE™ de R&D Systems).

Preparación de células dendríticas derivadas de médula ósea (BM-DC). La médula ósea se extrajo de la tibia de ratones no inyectados y los RBC se lisaron con tampón de lisis ACK. Las células se lavaron con medio RPMI completo (c/HEPES, gentamicina, piruvato de sodio, L-glutamina, y aminoácidos no esenciales) + 10 % de suero bovino fetal (FBS) y se contaron. Se cultivaron 2×10^6 células por pocillo en una placa de 6 pocillos con 3 ml/pocillo de RPMI completo +10 % de FBS + GM-CSF murino a 50 ng/ml + IL-4 murino a 50 ng/ml. Las células se cultivaron a 37 °C /5 % de CO₂ y se les proporcionó GM-CSF/IL-4 fresco en los días 2 y 4 de cultivo. En el día 5 de cultivo, las BM-DC no adherentes se cosecharon de los cultivos y los medios de cultivo respectivos se guardaron (medios acondicionados).

Cultivo de esplenocitos. Se cosecharon los bazo de los ratones respectivos y se prepararon los esplenocitos mediante la ruptura mecánica de los bazo a través de un filtro de malla de 70 µm seguido de tratamiento con tampón de lisis ACK (Invitrogen) para lisar los RBC. Los esplenocitos aislados se cultivaron en una placa de 48 pocillos a 2×10^6 esplenocitos/ml en 1 ml de RPMI completo + 10 % de FBS. Las células se trataron con poli I:C a 10 µg/ml, PMA a 10 µg/ml o se dejaron sin tratar. Las células se cultivaron como tal durante la noche y al día siguiente el sobrenadante se cosechó y se concentró 8 veces con el uso de filtros Amicon de 2 ml con corte de peso molecular (MWCO) de 3 kd. Los sobrenadantes concentrados se analizaron para detectar la IL-15 humana con el uso del estuche de IL-15 humana QUANTIKINE™ de R&D Systems.

Cultivo de BM-DC. Se sembraron 2×10^6 BM-DC/ml en una placa de 24 pocillos en 0.5 ml de RPMI completo fresco + 10 % de FBS y 0.5 ml de medios acondicionados. Las células se trataron con poli I:C a 25 µg/ml, LPS a 1 µg/ml o se dejaron sin tratar. Todas las condiciones se realizaron por duplicado. Las células se cultivaron como tal durante 36 h y después se cosechó el sobrenadante. Los sobrenadantes se concentraron 7 veces con el uso de filtros Amicon de 2 ml con MWCO de 3 kd. Los niveles de IL-15 humana en los sobrenadantes concentrados se analizaron con el uso del estuche de IL-15 humana QUANTIKINE™ de R&D Systems. El ARN de las células se aisló con el uso del estuche a escala minipreparativa RNeasy™ de Qiagen para el análisis por RT-PCR de los niveles del transcrito de IL-15 humana.

ELISA. El estuche de IL-15 humana QUANTIKINE™ de R&D Systems se usó para medir la IL-15 humana en suero y en los sobrenadantes concentrados de esplenocitos o BM-DC. El estuche se usó de conformidad con las instrucciones del fabricante. Se realizaron controles adicionales para validar la especificidad de este estuche (sólo detecta IL-15 humana, no de ratón) y para confirmar que no reacciona con poli I:C. Por lo tanto, 1000 pg/ml de IL-15 murino se analizaron en el ELISA (nota: el estándar más alto para la IL-15 humana es 250 pg/ml) y poli I:C solo a 25 µg/ml y 12.5 µg/ml. Se encontró que el estuche reacciona específicamente con la IL-15 humana (sin detección de IL-15 de ratón) y no reacciona con poli I:C.

RT-PCR. El ADNc se preparó a partir de ~200 ng de ARN aislado con el uso del sistema de síntesis de primera cadena para RT-PCR SUPERSRIPT™ III (Invitrogen) de conformidad con las instrucciones del fabricante. El transcrito específico de la IL-15 humana se amplificó con el uso de la polimerasa de ADN Taqman con los siguientes iniciadores: Iniciador directo de IL-15h: gtaaraagtgt atttgaaaaa aattgaagat (sec. con núm. de ident.:7); Iniciador inverso de IL-15h: tacaaaactc tgcaaaaatt cttaatat (sec. con núm. de ident.:8). La reacción de PCR se realizó con 40 ciclos de lo siguiente: desnaturalización a 94 °C durante 15 segundos, hibridación a 60 °C durante 30 segundos,

extensión a 72 °C y la reacción se mantuvo después a 4 °C. El transcrito se analizó en un gel de agarosa al 1% con el uso del colorante de carga de Promega a 6x.

Resultados. Se observó IL-15 humana en suero de ratón MAID 5217 heterocigoto inyectado con poli I:C, pero no en un ratón Balb/c WT del mismo sexo/edad inyectado con poli I:C (Figura 6; y Figura 10, panel a la derecha). De manera similar, se observó IL-15 humana en suero de ratón MAID 5218 heterocigoto inyectado con poli I:C, pero no en un ratón WT del mismo sexo/edad inyectado con poli I:C (Figura 10, panel a la izquierda). El nivel de IL-15 producida en ratón MAID 5218 fue comparable al de ratón MAID 5217 (Figura 10). Los esplenocitos estimulados con PMA de ratón MAID 5217 secretan bajos niveles de IL-15 humana *in vitro* (ninguno se observó en esplenocitos de ratones WT).

Además, las BM-DC derivadas de ratón MAID 5217 heterocigoto demuestran la secreción de IL-15 humana tras la estimulación *in vitro* con poli I:C (agonista de TLR3) y LPS (agonista de TLR4), así como niveles basales significativos. El análisis por RT-PCR demostró la presencia del transcrito específico de IL-15 humana sólo en BM-DC de ratones MAID 5217 heterocigotos.

En general, los datos indican que el ratón MAID 5217 heterocigoto y el ratón MAID 5218 heterocigoto expresan la IL-15 humana.

Ejemplo 4: Ratón homocigoto para la IL-15 humana

Los ratones heterocigotos se cruzaron, después se genotipificaron como se describió anteriormente. Los ratones homocigotos para IL-15h se mantienen por endogamia.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Rojas, Jose F.
Lai, Ka-Man Venus
Murphy, Andrew J.

<120> Animales con IL-15 humanizada

<130> 31013 (2200)

<150> 61891013

<151> 2013-10-15

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 208

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos sintéticos

<400> 1

atccatttag cttttctctg atcactaagt tggacagtg gacagtcttc ctcaaattag	60
cttagactat caaaattata ctgtattttt ggtatttcca gcgatogett cagttacaag	120
gctgttgaat gcacagaagc aaggataaca ctgatttttt cactggtcag aataaaaatt	180
attgattgct cttttgotta tagtatto	208

<210> 2

<211> 2029

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos sintéticos

<400> 2

aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt gaggaactgg aggaaaaaa tattaagaa	60
tttttgaga gttttgtaca tattgtccaa atgttcatca acacttcttg attgcaattg	120
attcttttta aagtgtttct gttattaaca aacatcactc tgctgcttag acataacaaa	180
acactgggca ttccaatgt gctgtcaaaa caagttttct tgtcagaag atgacagac	240
cttggatcag atgaactctt agaaatgaag gcagaaaaat gtcattgagt aatatagtga	300
ctatgaactt ctctcagact tactttactc atttttttaa tttattattg aaattgtaca	360
tattttgtga ataattgaaa atgttgaata aaaatatgta caagtgttgt tttttaagtt	420
gcactgatat tttaactctt attgcaaaat agcatittgt taagggtgat agtcaatta	480
tgtattggtg ggggtgggta ccaatgctgc aggtcaacag ctatgctggt aggctcctgc	540
cagtgtggaa ccactgacta ctggctctca ttgacttctt tactaagcat agcaaacaga	600

ggaagaattt gttatcagta agaaaaagaa gaactatatg tgaatcctct tctttabact 560
gtaatttagt tattgatgta taaagcaact gttatgaaat aaagaattg caataactgg 720
catataatgt ccacacgtaa atcttggttg tggtaggaat aataaacttc taatgatagg 780
tagaatggtg tgcaagcttg tccaatcacg gattgcaggg cactgoggg ccaggacaac 840
tttgaatgtg gcccaacaca aattcataba ctctcataba tctcgttttt agctcactag 900
ctatcattag cggtagtgta tttaaagtgt ggcacaagac aattcttctt attocastgt 960
ggccacggga aatcaaaaga ttgtaggccc ctggtataga aaactaatag tgacagtgtt 1020
catatttcat gctttcccaa atacaggtat tttatttca cattctttt gccatgttta 1080
tataataata aagaaaaacc ctgttgattt gttggagcca ttgttatctg acagaaaata 1140
attgtttata ttttttcac tacactgtct aaaattagca agctctcttc taatggaact 1200
gtaagaaaga tgaatatatt ttgttttatt ataaatttat ttcaccttaa ttctggtaat 1260
actcactgag tgactgtggg gtgggaaatg atctcttaag aatttgattt cttctctatc 1320
catagtaaac actcgttctc tgttgaaaca ttctctctat acccagtgcc cctatccatg 1380
tacatgtgtt cttattgttc tagtcaaacg gtgcttataa atatctttca gaaagttag 1440
gagaaatctg tctctatatt gaattccaat aatcctgtat tggctgtcag cttcttaact 1500
actctcagtc cagagaaata gtatttgga gccactcttt aaagtattg ggttggtgat 1560
tgtgggggtt gattttattt tttttttca attgggtag aattttttta tatacctgta 1620
ttttgtttt gttttatgta gctttctat tagggagagt aggaazagt caccattttc 1680
ttctctaat ttccagtcca gtcttaggg gaatgttagt cttcttgaga tgggggaagg 1740
aaaatcataa tgccagtcc tttgcaata atattttata gtgataaatg gttcattttg 1800
gttacatagg catacaagt ggcctaaaac ttggaattta ccagggctca aaattaaaat 1860
tcttacatta gttactgat atggatogct tcagttgato ttgaaaaat caaggcatag 1920
atctgcaacc tcgagataac ttgtataat gtatgtata cgaagtata tgcattgctt 1980
ccggcgggg ttttgggccc tccggggg gcccccctcc tcacggaga 2029

<210> 3
<211> 200
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótidos sintéticos

<400> 3
cattctcagt attgttttgc caagttctaa ttccatcaga cctcgacctg cagccctag 60
ataacttcgt ataattgtat ctatacgaag ttatgttagc gtgatagtcc ttcacgaaa 120

gtacaaqaat acacagaaaa ctgctgttta cattagtctt tcacgttttt attttattct 180
cacaaatttt aatgcaatac 200

<210> 4
<211> 162
<212> FRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polipéptido precursor de IL-5 murina

<400> 4

Met Lys Ile Leu Lys Pro Tyr Met Arg Asn Thr Ser Ile Ser Cys Tyr
1 5 10 15

Leu Cys Phe Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
20 25 30

Val Phe Ile Leu Gly Cys Val Ser Val Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
35 40 45

Asn Trp Ile Asp Val Arg Tyr Asp Leu Glu Lys Ile Glu Ser Leu Ile
50 55 60

Gln Ser Ile His Ile Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Asp Ser Asp Phe His
65 70 75 80

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Asn Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
85 90 95

Val Ile Leu His Glu Tyr Ser Asn Met Thr Leu Asn Glu Thr Val Arg
100 105 110

Asn Val Leu Tyr Leu Ala Asn Ser Thr Leu Ser Ser Asn Lys Asn Val
115 120 125

Ala Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Thr Phe
130 135 140

Thr Glu Phe Leu Gln Ser Phe Ile Arg Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
145 150 155 160

Thr Ser

<210> 5
<211> 162
<212> FRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido precursor de IL-15 de ratón/humana híbrida

<400> 5

Met Lys Ile Leu Lys Pro Tyr Met Arg Asn Thr Ser Ile Ser Cys Tyr
1 5 10 15

Leu Cys Phe Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
20 25 30

Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
35 40 45

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
50 55 60

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
65 70 75 80

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
85 90 95

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
100 105 110

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
115 120 125

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
130 135 140

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
145 150 155 160

Thr Ser

<210> 6

<211> 162

<212> FRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido de la isoforma 1 de la IL-15 humana

<400> 6

Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr
1 5 10 15

Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
 20 25 30

Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
 35 40 45

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
 50 55 60

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
 65 70 75 80

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 85 90 95

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
 100 105 110

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
 115 120 125

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
 130 135 140

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 145 150 155 160

Thr Ser

<210> 7
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético: Iniciador directo de IL-15h

<400> 7
 gtaaraagtg atttgaaaaa aattgaagat

30

<210> 8
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético: Iniciador inverso de IL-15h

<400> 8
 tacasaactc tgcasaaatt cttsaatat

29

REIVINDICACIONES

1. Un ratón modificado genéticamente, cuyo genoma comprende una sustitución en un locus endógeno de IL-15 de ratón, de un fragmento genómico de ratón que codifica un polipéptido maduro de IL-15 de ratón, con un segmento genómico humano que codifica un polipéptido maduro de IL-15 humana en donde los exones de IL-15 humana en dicho segmento genómico humano consisten en los exones 3, 4, 5 y 6 codificantes de la proteína IL-15 humana, para formar un gen de IL-15 humanizado, en donde los exones de IL-15 se encuentran enumerados con el primer exón codificante como el exón 1, y en donde el gen de IL-15 humanizado está bajo el control de todos los elementos reguladores endógenos corriente arriba de IL-15 de ratón en el locus endógeno de IL-15 de ratón.
2. El ratón modificado genéticamente de conformidad con la reivindicación 1, en donde el gen que codifica IL-15 humanizada codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 5.
3. El ratón modificado genéticamente de conformidad con la reivindicación 1, en donde el segmento genómico humano comprende, además, una secuencia intrónica humana corriente arriba del exón humano más cercano al extremo 5' y una secuencia humana no codificante de proteína corriente abajo del codón de parada humano y corriente abajo de la región 3' UTR humana.
4. Un método para producir un ratón modificado genéticamente; el método comprende modificar el genoma de un ratón mediante la sustitución de un fragmento genómico de ratón que codifica un polipéptido maduro de IL-15 de ratón en el locus endógeno de IL-15 de ratón con un segmento genómico humano que codifica un polipéptido maduro de IL-15 humana en donde los exones de IL-15 humana en dicho segmento genómico humano consisten en los exones 3, 4, 5 y 6 codificantes de la proteína IL-15 humana, para formar un gen de IL-15 humanizado, en donde los exones de IL-15 se encuentran enumerados con el primer exón codificante como el exón 1, y en donde el gen de IL-15 humanizado está bajo el control de todos los elementos reguladores endógenos corriente arriba de IL-15 de ratón en el locus endógeno de IL-15 de ratón.
5. El método de conformidad con la reivindicación 4, en donde el segmento genómico humano comprende, además, una secuencia intrónica humana corriente arriba del exón humano más cercano al extremo 5' y una secuencia humana no codificante de proteína corriente abajo del codón de parada humano y corriente abajo de la región 3' UTR humana.
6. El método de conformidad con la reivindicación 4, en donde el gen que codifica IL-15 humanizada codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 5.
7. Un ratón modificado genéticamente, cuyo genoma comprende un gen de IL-15 humanizado, en donde dicho gen de IL-15 humanizado comprende los exones 1 y 2 codificantes de la proteína IL-15 de ratón y un segmento genómico humano en donde los exones de IL-15 humana en dicho segmento genómico humano consisten en los exones 3, 4, 5 y 6 codificantes de la proteína IL-15 humana, en donde los exones de IL-15 se encuentran enumerados con el primer exón codificante como el exón 1, y en donde el gen de IL-15 humanizado está bajo el control de todos los elementos reguladores corriente arriba de IL-15 de ratón de un locus endógeno de IL-15 de ratón, y dicho gen de IL-15 humanizado codifica una proteína que comprende una secuencia polipeptídica madura de la IL-15 humana.
8. El ratón modificado genéticamente de conformidad con la reivindicación 7, en donde el gen que codifica IL-15 humanizada codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 5.
9. El ratón modificado genéticamente de conformidad con la reivindicación 7, en donde el segmento genómico humano comprende, además, una secuencia intrónica humana corriente arriba del exón humano más cercano al extremo 5' y una secuencia humana no codificante de proteína corriente abajo del codón de parada humano y corriente abajo de la región 3' UTR humana.
10. El ratón modificado genéticamente de conformidad con la reivindicación 7, en donde el gen de IL-15 humanizado se encuentra en una posición en el genoma del ratón que es distinta a la del locus endógeno de IL-15.
11. Un método para producir un ratón modificado genéticamente; el método comprende introducir en el genoma de un ratón un gen de IL-15 humanizado que comprende los exones 1 y 2 codificantes de la proteína IL-15 de ratón y un segmento genómico humano en donde los exones de IL-15 humana en dicho segmento genómico humano consisten en los exones 3, 4, 5 y 6 de la IL-15 humana, en donde los exones de IL-15 se encuentran enumerados con el primer exón codificante como el exón 1, y en donde el gen de IL-15 humanizado está bajo el control de todos los elementos reguladores corriente arriba de IL-15 de ratón de un locus endógeno de IL-15 de ratón, y dicho gen de IL-15 humanizado codifica una proteína que comprende una secuencia

polipeptídica madura de la IL-15 humana.

12. El método de conformidad con la reivindicación 11, en donde el gen de IL-15 humanizado se integra en el genoma en una posición que es distinta a la del locus endógeno de IL-15.

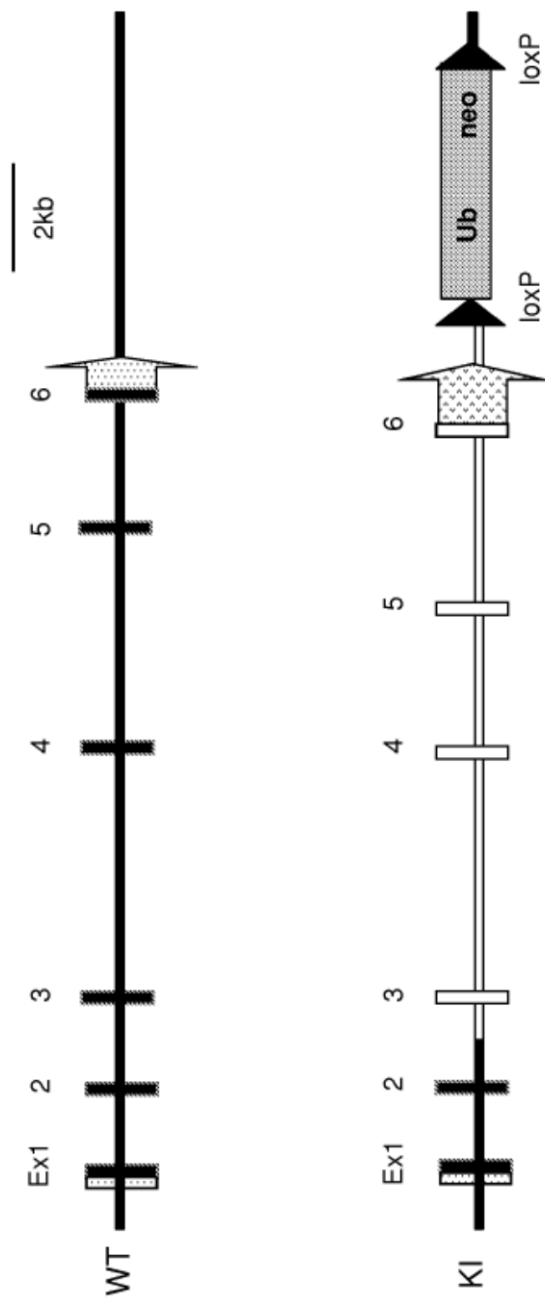


FIGURA 1

... . ATCCATTAGCCTTTCTCTGATCACTAAAGTTGGACAGTTGGACA
 GTC TTCCCTCAAA TTAGCTTAGACTATCAAAATTATAC TGTATTTTG
 GTATTCCAgcgatcgctTCAGTTACAAGGCTGTTGAATGCACAGAA
 GCAAGGATAACACTGATTTTTTTCAC TGGTCAGAAATAAAAATTATTGA
 TTGCTCTTTTGCTTATAGTATTC..... (SEC. CON NÚM. DE IDENT. :1)

FIGURA 2

..... . AATGTAACAGAACTCTGGATGTCAAAAGAAATGTGAGGAACCTGGAGGAAAAAATATTAAAGAAATTTTGCAG
AGTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACACTTCTTGATGTGCAATTGATCTTTTAAAGTGTCTCTGTATTAA
CAACATCACTCTGTCTTAGACATAACAAACACTCGGCATTTCAAATGTGCTGTCAAAACAAGTTTCTGTCAAG
AAGATGATCAGACCTTGGATCAGATGAACCTTTAGAAATGAAGGCAGAAAAATGTCATTGAGTAATATAGTGACTATGA
ACTTCTCTCAGACTTACTTTACTCATTTTTTTTAAATTTATTTGAAATTGTACATATTTGTGGAAATAATGTAAAAATGTT
GAATAAAAAATATGTACAAAGTGTGTTTAAAGTTGCACCTGATATTTACCTCTTAATTGCAAAAATAGCATTTGTTTAAAG
GGTGATAGTCAAAATTATGTATTGGTGGGGCTGGGTACCAATGCTGCAGGTCAACAGCTATGCTGGTAGGCTCCTGCCAG
TGTGGAACCACTGACTACTGGCTCTCAATTGACTTCTTACTAAGCATAGCAAAACAGAGGAAGAAATTTGTTATCAGTAAG
AAAAAGAAGAACTATATGTGAATCCTCTTCTTTTATACTGTAAATTTAGTTATTGATGTATAAAGCAACTGTTATGAAATA
AAGAAAATTGCAATAACTGGCATAATAATGTCCATCAGTAAATCTTGGTGGTGGCAATAATAAACTTCTACTGATAGG
TAGAATGGTGTGCAAGCTTGTCCAATCACGGATTGCAGGCCACATGCGGCCCAGGACAACCTTTGAATGTGGCCCCAACAC
AAATTCATAAACTTTCATACATCTCGTTTGTAGCTCATCAGCTATCATAGCGGTAGTGTATTTAAAGTGTGGCCCCAAG
ACAAATCTTCTTATCCAAATGTGGCCAGGGAAATCAAAAGATTGGATGCCCCCTGGTATAGAAAACTAATAGTGACAGT
GTTCAATATTTCATGCTTCCCAATAACAGGTATTTTATTTTTCACATCTCTTTTGCCATGTTTATATAATAATAAAGAAA
AACCTGTTGATTGTTGGAGCCATTGTTATCTGACAGAAAAATAATTGTTTATATTTTGGCACTACACTGTCTAAAAAT
TAGCAAGCTCTCTTCTAAATGGAACTGTAAAGAAAGATGAAATATTTTGTGTTTATATAAAATTTTACCTTAATCT
GGTAATACTCACTGAGTGAATCTTCTATCACCCAGTGCCCTATCCATGATGTTCTTAAAGAAATTTGATTTCTTCTATCCATAGTACAACT
CGTTCCTGTGAAACATCTTCTATCACCCAGTGCCCTATCCATGATGTTCTTATTTGCTCTAGTCAAAACGGT
GCTTATAAATATCTTTCAGAAAGTTTAGGAGAAATCTGTATCCTATTGACTTCCAATAATCATGTATTGGCTGTCAGC
TTCCTACCTACTCTCAGTCCAGAGAAATAGTATTTGGCAGCCACTCTTAAAGTTTATGGGTTGTGGATTGTGGCGGT
GATTTATTTTTTTTATTTCAATTGGGATAGAAATTTTTTAATAATACCTGTATTTTTTGTGTTTATGTAGCTTTTCTA
TTAGGGAGAGTAGGAAAAAGTGCAACATTTTCTTCTCTAAATTTCCAGTCCAGTCTTTAGGGGAAATGTAGTCTTCCCTGA
GATGGGGGAAAGGAAAAATCATAAATGCCAGTCACTTTGCAATAATATTTTATAGTATAAATGTTGTTTCAATTTTGGTTACAT
AGGCATACAAAGTGGGCTTAAAACTTGGAATTTACCAGGGCTCAAAATTAATAATCTTACATTAGTTACTCGATATGGAT
CGCTTCAGTTGATCTTAGAAAACTCAAGGCATAGATCTGCAACctcgagATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGGAAG
TTATATGCATGGCCCTCCGGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGGGCGCCCTCCTCAGGCGA SEC. CON NÚM. DE
IDENT.:2) 2 . 6Kb

FIGURA 3

2 . 6kb... . CATTCTCAGTATTGTTTGGCCCAAGTTCTAATTCCATCAGACC
 TCGACCTGCAGCCCCCTAGATAACTTCGTAATAATGTATGCTATACGAAGT
TATgctagcGTGATAGTCCTTCACGGAAAGTACAAGAAATACACAGAAA
 CTGCTGTTTACATTAGTCCTTCACGTTTTTATTATTCTCACAATTT
 TAATGCAATAC... (SEC. CON NÚM. DE IDENT. :3)

FIGURA 4

mI115_precursor	1	MKILKPYMRNTSISCYLCFLNLSHFLTEAG	30
Regn_Hybrid_m/h	1	MKILKPYMRNTSISCYLCFLNLSHFLTEAG	30
hIL15 isoform 1	1	MRISKPHLRISISIQCYLCFLNLSHFLTEAG	30
mI115_precursor	31	IHVILGCVSVGLPKTEANWIDVRYDLEKI	60
Regn_Hybrid_m/h	31	IHVILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKI	60
hIL15 isoform 1	31	IHVILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKI	60
mI115_precursor	61	ESLIQSIHIDTTLTYTDSDFHPCKVTAMNC	90
Regn_Hybrid_m/h	61	EDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKC	90
hIL15 isoform 1	61	EDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKC	90
mI115_precursor	91	FLLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANS	120
Regn_Hybrid_m/h	91	FLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANN	120
hIL15 isoform 1	91	FLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANN	120
mI115_precursor	121	TLSSNKNVAESGCKECEELEKEKTFTEFLQS	150
Regn_Hybrid_m/h	121	SLSSNGNVTESGCKECEELEKEKNIKEFLQS	150
hIL15 isoform 1	121	SLSSNGNVTESGCKECEELEKEKNIKEFLQS	150
mI115_precursor	151	FIRIVQMFINTS 162 (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4)	
Regn_Hybrid_m/h	151	FVHIVQMFINTS 162 (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5)	
hIL15 isoform 1	151	FVHIVQMFINTS 162 (SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6)	

FIGURA 5

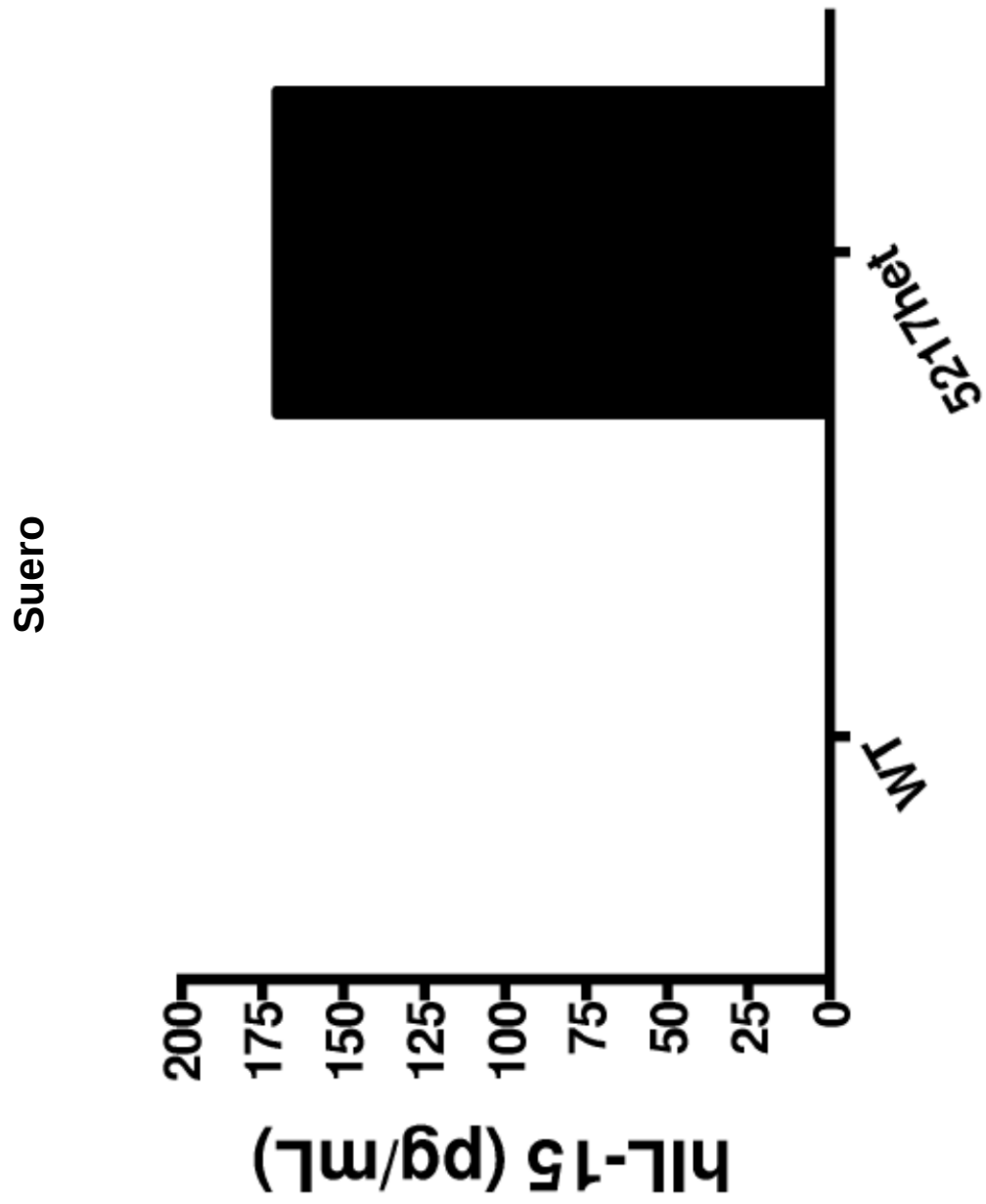


FIGURA 6

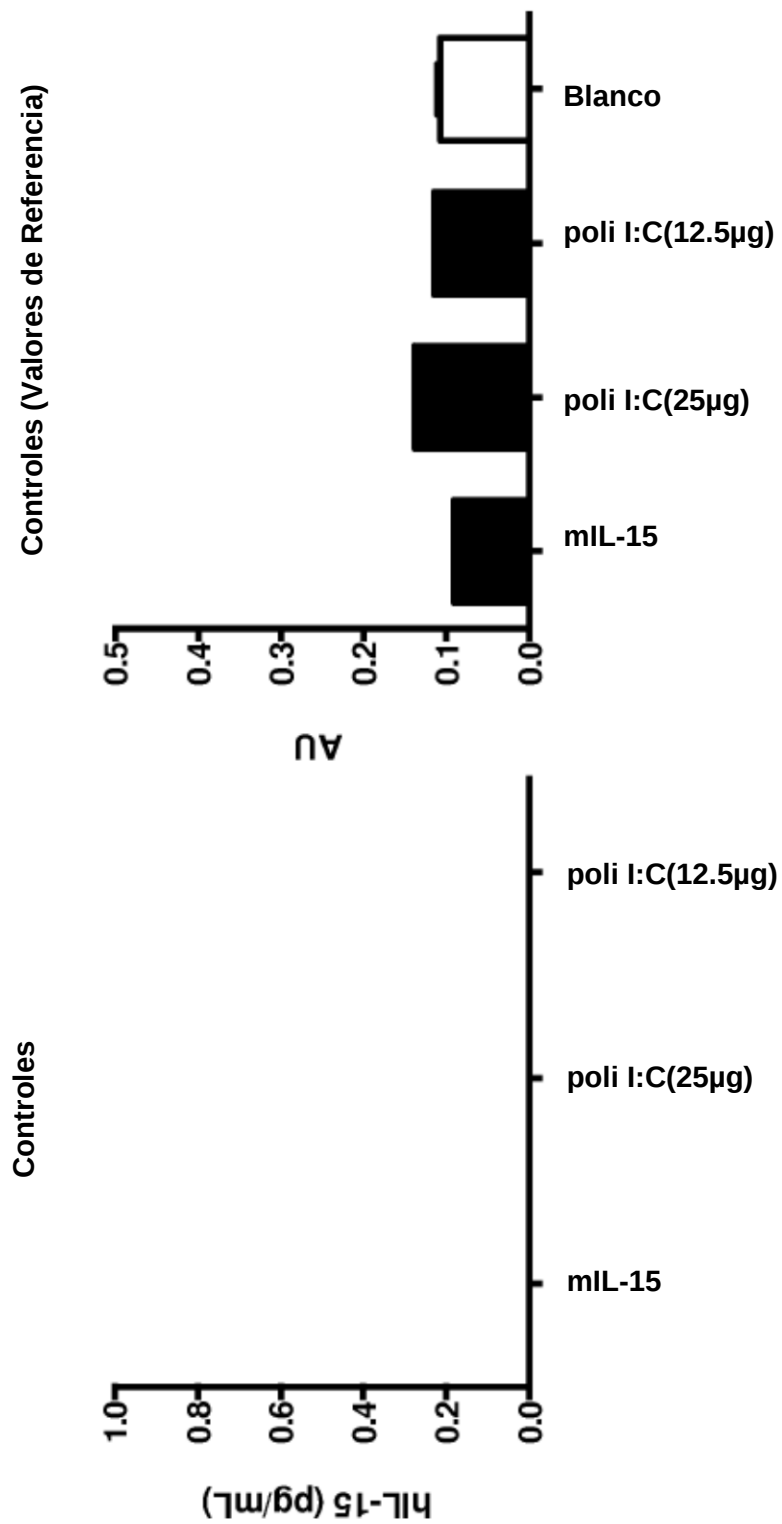


FIGURA 7

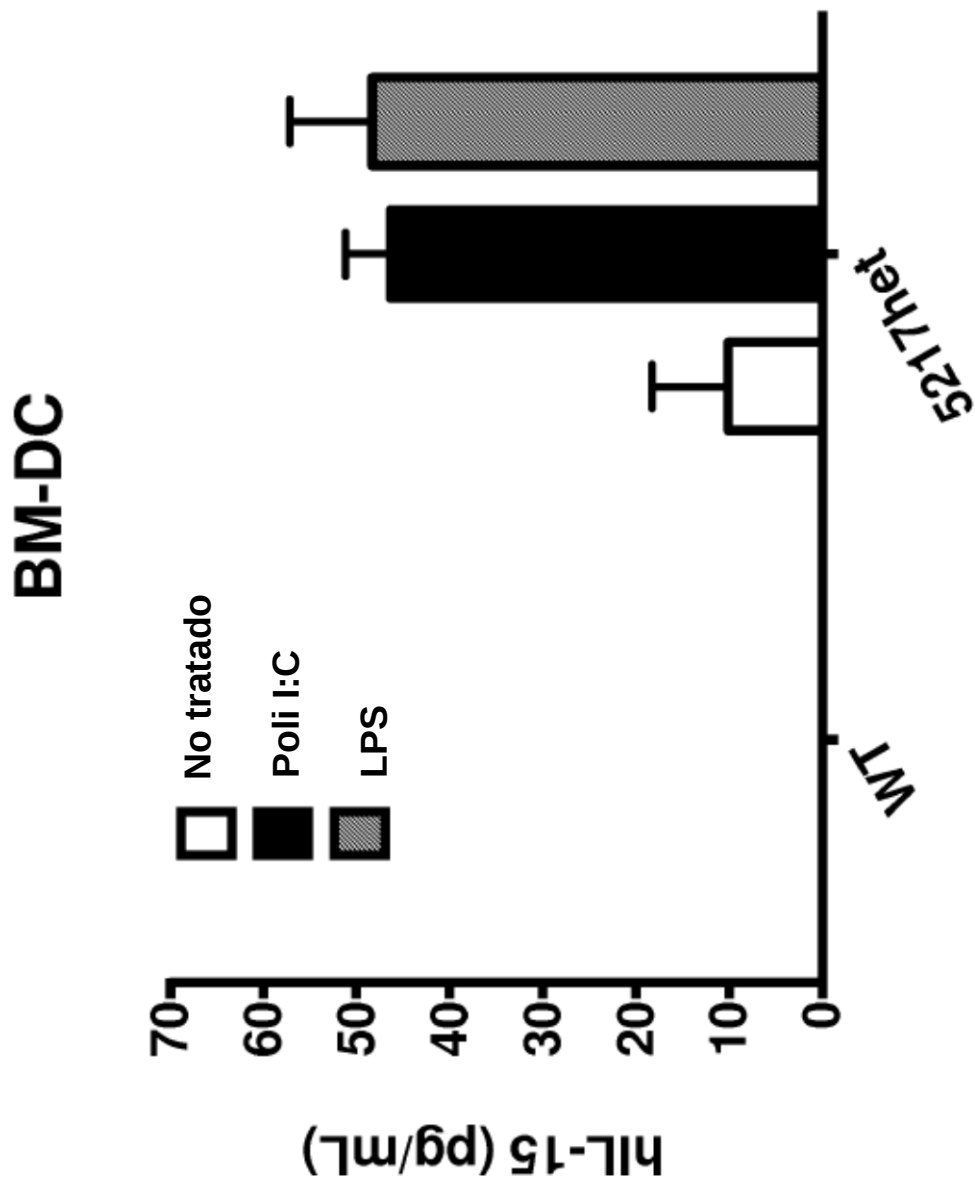


FIGURA 8

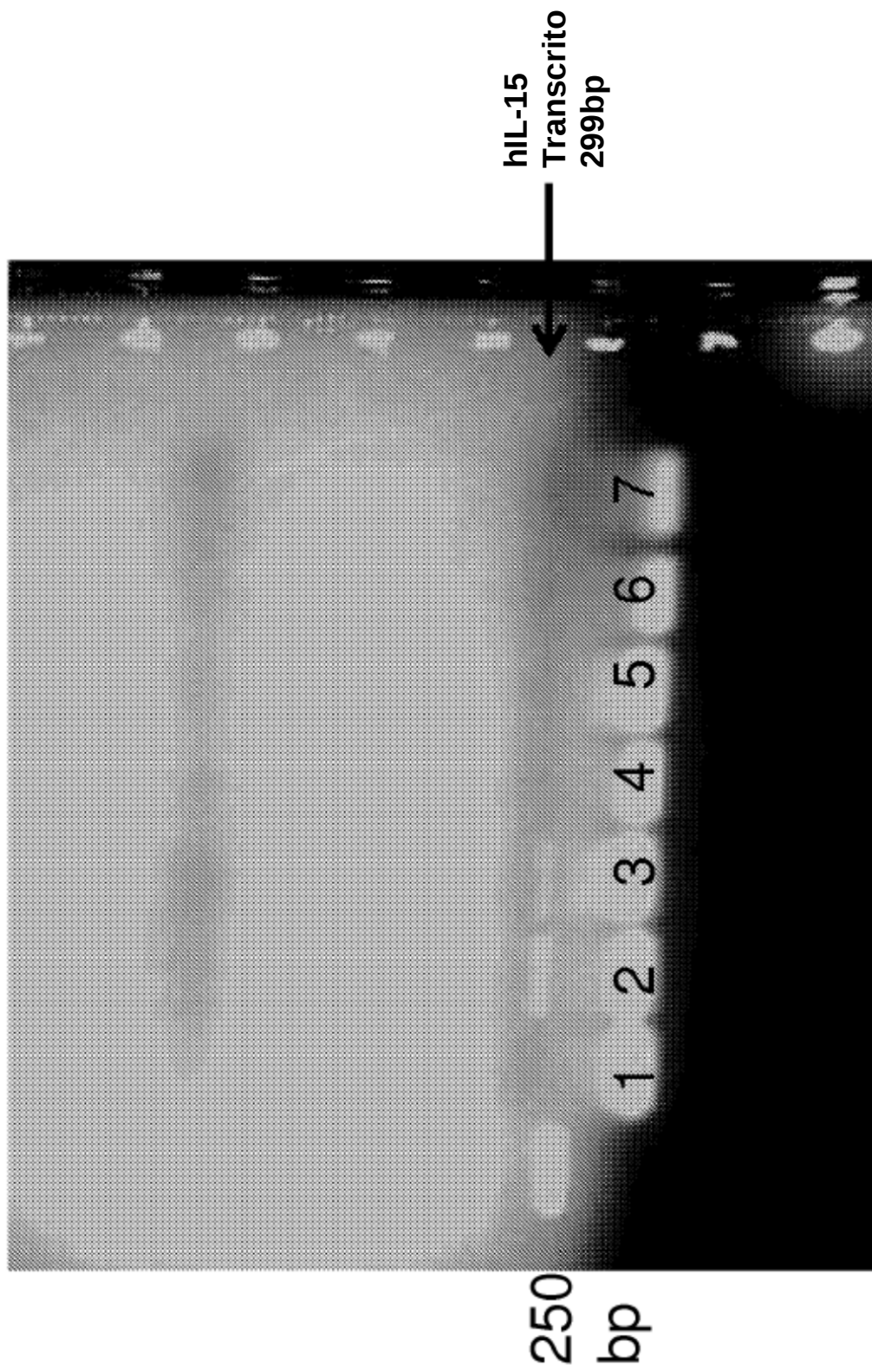


FIGURA 9

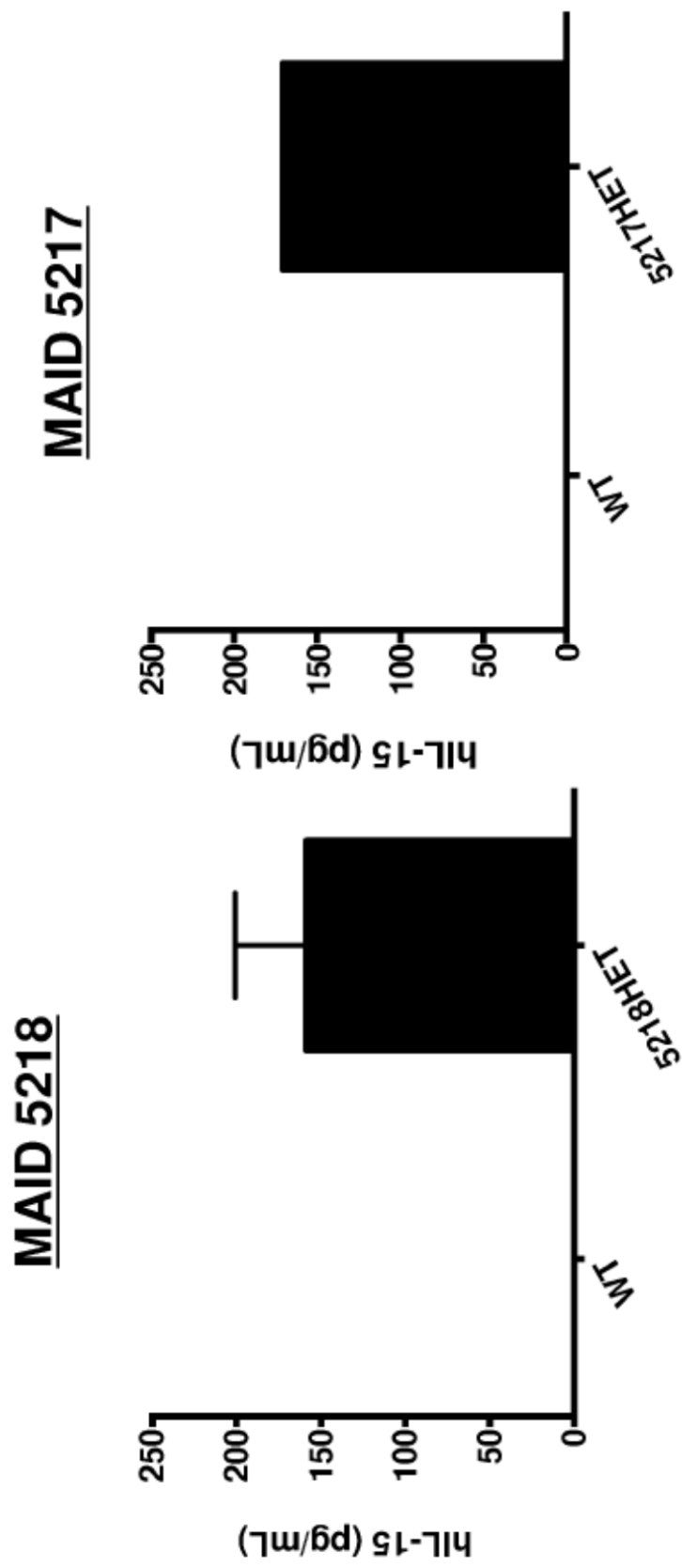


FIGURA 10