

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 950 399**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

A01K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2016** **PCT/US2016/027164**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016** **WO16168212**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2016** **E 16720234 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2023** **EP 3282835**

54 Título: **Ratones humanizados Sirpa-IL15 insertados y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

13.04.2015 US 201562146938 P

16.04.2015 US 201562148667 P

27.01.2016 US 201662287842 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2023

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (33.3%)

**777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591-6707, US;**

**YALE UNIVERSITY (33.3%) y
INSTITUTE FOR RESEARCH IN BIOMEDICINE
(IRB) (33.3%)**

72 Inventor/es:

HERNDLER-BRANDSTETTER, DIETMAR;

FLAVELL, RICHARD A.;

FRLETA, DAVOR;

GURER, CAGAN;

MANZ, MARKUS, GABRIEL;

MURPHY, ANDREW J.;

PALM, NOAH W.;

SHAN, LIANG;

STEVENS, SEAN;

STROWIG, TILL;

YANCOPOULOS, GEORGE D. y

DE ZOETE, MARCEL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 950 399 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ratones humanizados Sirpa-IL15 insertados y métodos de uso de los mismos

5 Referencia cruzada

Esta solicitud reivindica el beneficio de las solicitudes provisionales de EE. UU. n.º 62/146.938, presentada el 13 de abril de 2015; 62/148.667, presentada el 16 de abril de 2015; y 62/287.842, presentada el 27 de enero de 2016.

10 Campo de la invención

La invención se refiere al campo de animales no humanos modificados genéticamente.

Introducción

15 Los animales no humanos modificados genéticamente, tales como ratones humanizados, son muy prometedores para la investigación de transferencia, ya que permiten modelar y estudiar enfermedades humanas *in vivo*. En la última década, se ha logrado un progreso considerable en el desarrollo de ratones humanizados mediante la inserción genética de genes humanos que son esenciales para el correcto desarrollo y funcionamiento de las células inmunitarias humanas en el ratón. Sin embargo, algunas limitaciones aún restringen la utilidad de los ratones humanizados en la investigación de transferencia. En particular, el desarrollo y la supervivencia de los linfocitos T humanos es subóptimo.

25 Aunque se ha demostrado que el modelo de médula ósea-hígado-timo (BLT) mejora la reconstitución de linfocitos T intestinales en ratones NS/NSG-BLT (Denton P.W., Nochi T., Lim A. *et al.* Mucosal Immunol 2012; 5:555-566, Nochi T., Denton P.W., Wahl A. *et al.* Cell Rep 2013; 3:1874-1884), se ha comprobado que esos ratones desarrollan la enfermedad de injerto contra hospedador, lo que provoca una infiltración masiva de células inmunitarias en múltiples tejidos (Greenblatt M.B., Vrbanc V., Tivey T. *et al.* PLoS One 2012; 7:e44664). Por lo tanto, los modelos de ratón humanizado actuales aún carecen del desarrollo y la función adecuados de los linfocitos T humanos. En particular, la ausencia de linfocitos T de memoria residentes en tejidos humanos impide el uso de ratones humanizados como una herramienta preclínica para desarrollar y probar estrategias de inmunización más eficaces que tienen como objetivo inducir una inmunidad duradera de las mucosas contra patógenos como el VIH.

35 Con el fin de comprender mejor el desarrollo y la supervivencia de los linfocitos T residentes en tejidos humanos y proporcionar un modelo para probar nuevas estrategias de inmunización para inducir una inmunidad duradera de las mucosas dependiente de linfocitos T, sería útil tener un animal no humano modificado genéticamente que desarrolle linfocitos T residentes en tejidos humanos. Dicho modelo de ratón también se podría utilizar para estudiar la interacción de las células inmunitarias residentes en tejidos humanos con la microbiota intestinal, por ejemplo, cómo la microbiota puede dar forma al desarrollo y la supervivencia de las células inmunitarias humanas en el intestino delgado y el colon.

40 Además, existe una necesidad en la materia de modelos animales no humanos de desarrollo y función de linfocitos citolíticos naturales (NK) humanos.

Sumario

45 Se proporcionan ratones modificados genéticamente que expresan SIRPα humana e IL-15 humana a partir del genoma del ratón. También se divulgan métodos para hacer que animales no humanos expresen SIRPα humana e IL-15 humana a partir del genoma del animal no humano, y métodos para utilizar animales no humanos que expresen SIRPα humana e IL-15 humana a partir del genoma animal no humano. Estos animales y métodos encuentran muchos usos en la materia, incluidos, por ejemplo, en el modelado del desarrollo y la función de linfocitos citolíticos naturales (NK) y/o linfocitos T humanos; en el modelado de la infección por patógenos humanos de células NK y/o linfocitos T humanos; en la selección *in vivo* de agentes que inhiben la infección por un patógeno que activa, induce y/o se dirige a linfocitos T y/o células NK; en la selección *in vivo* de agentes que modulan el desarrollo y/o la función de células NK y/o linfocitos T humanos, por ejemplo, en un estado sano o enfermo; en la selección *in vivo* de agentes que son tóxicos para las células NK y/o linfocitos T humanos; en la selección *in vivo* de agentes que evitan, mitigan o revierten los efectos tóxicos de los agentes tóxicos en las células NK y/o linfocitos T humanos; en la selección *in vivo* de vacunas candidatas inductoras de linfocitos T; y en la selección *in vivo* e *in vitro* de agentes que inhiben el crecimiento tumoral y/o la infección mediante la activación de procesos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, del inglés *antibody dependent cellular cytotoxicity*) mediados por células NK.

60 En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un ratón modificado genéticamente como se establece en la reivindicación 1.

65 El promotor del gen *SIRPα* es un promotor del gen *SIRPα* de ratón endógeno en el locus del gen *SIRPα* de ratón. El ratón modificado genéticamente incluye una mutación anuladora en el gen *SIRPα* no humano en el locus del gen *SIRPα* de ratón. En dicha realización, la mutación anuladora es una eliminación de al menos los exones 2 a 4 de

SIRPα de ratón. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es heterocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína *SIRPα* humana. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es homocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína *SIRPα* humana.

5 En otra realización del primer aspecto, o en una realización adicional de cualquiera de las realizaciones anteriores del mismo, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína *SIRPα* humana incluye la secuencia codificante y no codificante genómica de *SIRPα* humana.

10 En otra realización del primer aspecto, o en una realización adicional de cualquiera de las realizaciones anteriores del mismo, la proteína *SIRPα* humana es un fragmento funcional de una proteína *SIRPα* humana de longitud completa. En dicha realización, el fragmento funcional incluye un dominio extracelular de *SIRPα* humana, por ejemplo, un dominio extracelular que incluye al menos los aminoácidos 28 a 362 de la SEQ ID NO: 12.

15 El promotor del gen *IL-15* es un promotor del gen *IL-15* de ratón endógeno en el locus del gen *IL-15* de ratón de acuerdo con la reivindicación 1. El ratón modificado genéticamente incluye una mutación anuladora en el gen *IL-15* de ratón en el locus del gen *IL-15* de ratón. En dicha realización, la mutación anuladora es una eliminación de al menos los exones 5 a 8 de *IL-15* de ratón. En otra de dichas realizaciones, el modificado genéticamente es heterocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína *IL-15* humana. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es homocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína *IL-15* humana.

20 En otra realización del primer aspecto, o en una realización adicional de cualquiera de las realizaciones anteriores del mismo, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína *IL-15* humana incluye la secuencia codificante y no codificante genómica de *IL-15* humana.

25 En otra realización del primer aspecto, o en una realización adicional de cualquiera de las realizaciones anteriores del mismo, la proteína *IL-15* humana es un fragmento funcional de una proteína *IL-15* humana de longitud completa.

30 El ratón modificado genéticamente es inmunodeficiente. Por ejemplo, en una realización, el ratón modificado genéticamente incluye una inactivación del gen *Rag2*. En otra realización, el ratón modificado genéticamente incluye una inactivación del gen *IL2γ*, o una inactivación del gen *Rag2* y una inactivación del gen *IL2γ*.

35 En otra realización del primer aspecto, o en una realización adicional de cualquiera de las realizaciones anteriores del mismo, el ratón modificado genéticamente incluye un injerto de células hematopoyéticas humanas. En dicha realización, el ratón genéticamente modificado incluye una infección con un patógeno humano. En una realización, donde el ratón genéticamente modificado incluye una infección con un patógeno humano, el patógeno humano activa, induce y/o se dirige a los linfocitos T y/o a linfocitos citolíticos naturales (NK). En otra realización, donde el ratón modificado genéticamente incluye una infección con un patógeno humano, el patógeno humano es un patógeno que afecta (por ejemplo, infecta) el intestino humano. En dicha realización, el patógeno humano es un rotavirus humano. En otra realización, donde el ratón genéticamente modificado incluye una infección con un patógeno humano, el patógeno afecta (por ejemplo, infecta) el pulmón humano. En dicha realización, el patógeno humano es el virus de la gripe. En otra realización, donde el ratón genéticamente modificado incluye una infección con un patógeno humano, el patógeno afecta (por ejemplo, infecta) el hígado humano. En otra realización más, un ratón modificado genéticamente incluye un injerto de células hematopoyéticas humanas y un tumor, por ejemplo, un tumor humano, por ejemplo, tumor humano trasplantado.

45 En la presente invención, el promotor del gen *SIRPα* es un promotor del gen *SIRPα* de ratón endógeno en el locus del gen *SIRPα* y el ratón modificado genéticamente incluye una mutación anuladora en el gen *SIRPα* en el locus del gen *SIRPα* de ratón. En dicha realización, la mutación anuladora es una eliminación de al menos los exones 2 a 4 de *SIRPα* de ratón. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es heterocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína *SIRPα* humana. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es homocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína *SIRPα* humana.

50 En una realización adicional de cualquiera de las realizaciones anteriores de la misma, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína *SIRPα* humana incluye la secuencia codificante y no codificante genómica de *SIRPα* humana.

55 En una realización adicional de cualquiera de las realizaciones anteriores de la misma, la proteína *SIRPα* humana es un fragmento funcional de una proteína *SIRPα* humana de longitud completa. En dicha realización, el fragmento funcional incluye un dominio extracelular de *SIRPα* humana, por ejemplo, un dominio extracelular que incluye los aminoácidos 28 a 362 de la SEQ ID NO: 12.

60 En la presente invención, el promotor del gen *IL-15* es un promotor del gen *IL-15* no humano endógeno en el locus del gen *IL-15* de ratón e incluye una mutación anuladora en el gen *IL-15* de ratón en el locus del gen *IL-15* de ratón. En una realización, la mutación anuladora es una eliminación de al menos los exones 5 a 8 de *IL-15* de ratón. En dicha

realización, el ratón modificado genéticamente es heterocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 humana. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es homocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 humana.

- 5 En una realización adicional de cualquiera de las realizaciones anteriores de la misma, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 humana incluye la secuencia codificante y no codificante genómica de IL-15 humana.

En una realización adicional de cualquiera de las realizaciones anteriores de la misma, la proteína IL-15 humana es un fragmento funcional de una proteína IL-15 humana de longitud completa.

- 10 En la presente invención, el ratón modificado genéticamente es inmunodeficiente. Por ejemplo, en una realización, el ratón modificado genéticamente incluye una inactivación del gen *Rag2*. En otra realización, el ratón modificado genéticamente incluye una inactivación del gen *IL2 γ* , o una inactivación del gen *Rag2* y una inactivación del gen *IL2 γ* .

- 15 En la presente invención, el promotor del gen *SIRP α* es un promotor del gen *SIRP α* de ratón endógeno en el locus del gen *SIRP α* de ratón y el ratón modificado genéticamente incluye una mutación anuladora en el gen *SIRP α* de ratón en el locus del gen *SIRP α* de ratón. En una realización, la mutación anuladora es una eliminación de al menos los exones 2 a 4 de *SIRP α* de ratón. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es heterocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína SIRP α humana. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es homocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína SIRP α humana.

En una realización adicional de cualquiera de las realizaciones anteriores de la misma, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína SIRP α humana incluye la secuencia codificante y no codificante genómica de SIRP α humana.

- 25 En una realización adicional de cualquiera de las realizaciones anteriores de la misma, la proteína SIRP α humana es un fragmento funcional de una proteína SIRP α humana de longitud completa. En dicha realización, el fragmento funcional incluye un dominio extracelular de SIRP α humana, por ejemplo, un dominio extracelular que incluye al menos los aminoácidos 28 a 362 de la SEQ ID NO: 12.

En la presente invención, el promotor del gen *IL-15* es un promotor del gen *IL-15* de ratón endógeno en el locus del gen *IL-15* de ratón.

- 35 El ratón modificado genéticamente incluye una mutación anuladora en el gen *IL-15* de ratón en el locus del gen *IL-15* de ratón. En una realización, la mutación anuladora es una eliminación de al menos los exones 5 a 8 de *IL-15* de ratón. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es heterocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 humana. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es homocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 humana.

En una realización adicional de cualquiera de las realizaciones anteriores de la misma, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 humana incluye la secuencia codificante y no codificante genómica de IL-15 humana.

- 45 En una realización adicional de cualquiera de las realizaciones anteriores de la misma, la proteína IL-15 humana es un fragmento funcional de una proteína IL-15 humana de longitud completa.

En la presente invención, el ratón modificado genéticamente es inmunodeficiente. Por ejemplo, en una realización, el ratón modificado genéticamente incluye una inactivación del gen *Rag2*. En otra realización, el ratón modificado genéticamente incluye una inactivación del gen *IL2 γ* , o una inactivación del gen *Rag2* y una inactivación del gen *IL2 γ* .

- 50 En la presente invención, el promotor del gen *SIRP α* es un promotor del gen *SIRP α* no humano endógeno en el locus del gen *SIRP α* de ratón e incluye una mutación anuladora en el gen *SIRP α* en el locus del gen *SIRP α* . En una realización, la mutación anuladora es una eliminación de al menos los exones 2 a 4 de *SIRP α* de ratón. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es heterocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína SIRP α humana. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es homocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína SIRP α humana.

En otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína SIRP α humana incluye la secuencia codificante y no codificante genómica de SIRP α humana.

- 60 En otra realización, la proteína SIRP α humana es un fragmento funcional de una proteína SIRP α humana de longitud completa. En dicha realización, el fragmento funcional incluye un dominio extracelular de SIRP α humana, por ejemplo, un dominio extracelular que incluye al menos los aminoácidos 28 a 362 de la SEQ ID NO: 12.

En la presente invención, el promotor del gen *IL-15* es un promotor del gen *IL-15* de ratón endógeno en el locus del

gen *IL-15* de animal no humano y el ratón modificado genéticamente incluye una mutación anuladora en el gen *IL-15* de ratón en el locus del gen *IL-15* de ratón. En una realización, la mutación anuladora es una eliminación de al menos los exones 5 a 8 de *IL-15* de ratón. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es heterocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 humana. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es homocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 humana.

En otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 humana incluye la secuencia codificante y no codificante genómica de IL-15 humana.

En otra realización, la proteína IL-15 humana es un fragmento funcional de una proteína IL-15 humana de longitud completa.

En otra realización, el ratón modificado genéticamente incluye una inactivación del gen *Rag2*.

En otra realización, el ratón modificado genéticamente incluye una inactivación del gen *IL2ry*.

En la presente invención, el promotor del gen *SIRPα* es un promotor del gen *SIRPα* no humano endógeno en el locus del gen *SIRPα* de ratón y el ratón modificado genéticamente incluye una mutación anuladora en el gen *SIRPα* no humano en el locus del gen *SIRPα* de ratón. En una realización, la mutación anuladora es una eliminación de al menos los exones 2 a 4 de *SIRPα* de ratón. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es heterocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína SIRPα humana. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es homocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína SIRPα humana.

En otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína SIRPα humana incluye la secuencia codificante y no codificante genómica de SIRPα humana.

En una realización, la proteína SIRPα humana es un fragmento funcional de una proteína SIRPα humana de longitud completa. En dicha realización, el fragmento funcional incluye un dominio extracelular de SIRPα humana, por ejemplo, un dominio extracelular que incluye los aminoácidos 28 a 362 de la SEQ ID NO: 12.

En la presente invención, el promotor del gen *IL-15* es un promotor del gen *IL-15* de ratón endógeno en el locus del gen *IL-15* de ratón y el ratón modificado genéticamente incluye una mutación anuladora en el gen *IL-15* de ratón en el locus del gen *IL-15* de ratón. En una realización, la mutación anuladora es una eliminación de al menos los exones 5 a 8 de *IL-15* de ratón. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es heterocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 humana. En otra de dichas realizaciones, el ratón modificado genéticamente es homocigoto para el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 humana.

En otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 humana incluye la secuencia codificante y no codificante genómica de IL-15 humana.

En otra realización, la proteína IL-15 humana es un fragmento funcional de una proteína IL-15 humana de longitud completa.

En otra realización, el ratón modificado genéticamente incluye una inactivación del gen *Rag2*.

En otra, el ratón modificado genéticamente incluye una inactivación del gen *IL2ry*.

En el presente documento se divulga un método para hacer que un animal no humano exprese una proteína IL-15 humana y una proteína SIRPα humana, que incluye: introducir en un genoma de un primer animal no humano una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína IL-15 humana, en donde la secuencia que codifica la proteína IL-15 humana está unida operativamente a una secuencia promotora del gen *IL-15*; introducir en un genoma de un segundo animal no humano una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína SIRPα humana, en donde la secuencia que codifica la proteína SIRPα humana está unida operativamente a una secuencia promotora de *SIRPα*; y hacer que un tercer animal no humano incluya la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 humana y la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína SIRPα humana, en donde el tercer animal no humano expresa la proteína IL-15 humana y la proteína SIRPα humana.

Las etapas para introducir el ácido nucleico en el genoma pueden incluir la generación de un animal no humano a partir de una célula madre pluripotente que incluye el ácido nucleico que codifica la IL-15 humana o la SIRPα humana.

El primer animal puede ser un animal diferente al segundo animal, y la etapa de hacer el tercer animal puede incluir cruzar el primer y el segundo animal.

El primer animal y el segundo animal pueden ser el mismo, la etapa de introducir en el genoma del primer animal puede incluir poner en contacto una primera célula madre pluripotente con la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 humana para obtener una segunda célula madre pluripotente, la etapa de introducir en el genoma del segundo animal puede incluir poner en contacto la segunda célula madre pluripotente con la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína SIRPα humana para obtener una tercera célula madre pluripotente, y el tercer animal no humano puede hacerse a partir de la tercera célula madre pluripotente.

En el presente documento se divulga un método para hacer que un animal no humano exprese una proteína IL-15 humana y una proteína SIRPα humana, que incluye: introducir en un genoma de un primer animal no humano una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína SIRPα humana, en donde la secuencia que codifica la proteína SIRPα humana está unida operativamente a una secuencia promotora del gen *SIRPα*; introducir en un genoma de un segundo animal no humano una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína IL-15 humana, en donde la secuencia que codifica la proteína IL-15 humana puede unirse operativamente a una secuencia promotora de *IL-15*; y hacer que un tercer animal no humano incluya la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 humana y la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína SIRPα humana, en donde el tercer animal no humano expresa la proteína IL-15 humana y la proteína SIRPα humana.

En los métodos descritos anteriormente, el primer animal y el segundo animal pueden ser el mismo, la etapa de introducir en el genoma del primer animal puede incluir poner en contacto una primera célula madre pluripotente con la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína SIRPα humana para obtener una segunda célula madre pluripotente, la etapa de introducir en el genoma del segundo animal puede incluir poner en contacto la segunda célula madre pluripotente con la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 humana para obtener una tercera célula madre pluripotente, y el tercer animal no humano puede hacerse a partir de la tercera célula madre pluripotente.

En los métodos descritos anteriormente, la célula madre pluripotente puede ser una célula ME o una célula MPi.

En los métodos descritos anteriormente, la célula madre pluripotente puede ser deficiente para Rag2.

En los métodos descritos anteriormente, la célula madre pluripotente puede ser deficiente para IL2ry.

En los métodos descritos anteriormente, el tercer animal no humano puede ser deficiente en uno o ambos de Rag2 e IL2ry.

En los métodos descritos anteriormente, la secuencia promotora de *IL-15* puede ser una secuencia promotora de *IL-15* humano.

En los métodos descritos anteriormente, la secuencia promotora de *IL-15* puede ser una secuencia para el promotor de *IL-15* de animal no humano endógeno.

En los métodos descritos anteriormente, la integración puede dar como resultado un reemplazo del gen *IL-15* no humano en el locus del gen *IL-15* no humano.

En los métodos descritos anteriormente, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 humana puede incluir secuencias codificantes y no codificantes genómicas de IL-15 humana.

En el presente documento se divulga un método para injertar un animal no humano genéticamente modificado que expresa una proteína IL-15 humana, que incluye: trasplantar una población de células que incluyen células hematopoyéticas humanas en el animal no humano genéticamente modificado fabricado mediante un método de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. El trasplante puede incluir inyección en la vena de la cola, inyección en el hígado fetal o inyección retroorbitaria.

En este método de injerto divulgado en el presente documento, el animal no humano modificado genéticamente puede irradiarse de forma subletal antes del trasplante.

En este método de injerto, las células hematopoyéticas humanas pueden ser células CD34+.

En este método de injerto, las células hematopoyéticas humanas pueden ser de hígado fetal, de la médula ósea adulta o de sangre del cordón umbilical.

En el presente documento se divulga un método para determinar la eficacia de un anticuerpo terapéutico o una proteína de unión a antígeno candidatos para destruir una célula diana, incluyendo el método: administrar el anticuerpo terapéutico o la proteína de unión a antígeno candidatos a un animal no humano modificado genéticamente, en donde el animal no humano modificado genéticamente es deficiente para un sistema inmunitario endógeno e incluye: (i) una secuencia de ácido nucleico incorporada al genoma del animal no humano modificado genéticamente, cuya secuencia codifica una proteína SIRPα humana y está unida operativamente a un promotor del gen *SIRPα*, (ii) una secuencia de ácido nucleico incorporada al genoma del animal no humano modificado genéticamente, cuya secuencia codifica una

proteína IL-15 humana y está unida operativamente a un promotor del gen *IL-15* y (iii) un injerto de células hematopoyéticas humanas, en donde el animal no humano genéticamente modificado expresa la proteína SIRPα humana y la proteína IL-15 humana; y determinar si el anticuerpo terapéutico candidato o la proteína de unión a antígeno modula una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mediada por células NK contra la célula diana en el animal no humano genéticamente modificado.

En el presente documento se divulga un método para determinar la eficacia de un anticuerpo terapéutico o una proteína de unión a antígeno candidatos para destruir una célula diana que incluye: aislar una célula NK de un animal no humano modificado genéticamente, en donde el animal no humano modificado genéticamente es deficiente para un sistema inmunitario endógeno e incluye: (i) una secuencia de ácido nucleico incorporada al genoma del animal no humano modificado genéticamente, cuya secuencia codifica una proteína SIRPα humana y está unida operativamente a un promotor del gen *SIRPα*, (ii) una secuencia de ácido nucleico incorporada al genoma del animal no humano modificado genéticamente, cuya secuencia codifica una proteína IL-15 humana y está unida operativamente a un promotor del gen *IL-15* y (iii) un injerto de células hematopoyéticas humanas, en donde el animal no humano genéticamente modificado expresa la proteína SIRPα humana y la proteína IL-15 humana; poner en contacto la célula NK aislada con el anticuerpo terapéutico o la proteína de unión a antígeno candidatos y la célula diana; y determinar la actividad citolítica dependiente del anticuerpo o de la proteína de unión al antígeno de la célula NK aislada contra la célula diana.

En el presente documento se divulga un método para seleccionar un anticuerpo terapéutico candidato o una proteína de unión a antígeno para mejorar la eficacia en la destrucción de una célula diana que incluye: administrar el anticuerpo terapéutico o la proteína de unión a antígeno candidatos a un animal no humano modificado genéticamente, en donde el animal no humano modificado genéticamente es deficiente para un sistema inmunitario endógeno e incluye: (i) una secuencia de ácido nucleico incorporada al genoma del animal no humano modificado genéticamente, cuya secuencia codifica una proteína SIRPα humana y está unida operativamente a un promotor del gen *SIRPα*, (ii) una secuencia de ácido nucleico incorporada al genoma del animal no humano modificado genéticamente, cuya secuencia codifica una proteína IL-15 humana y está unida operativamente a un promotor del gen *IL-15* y (iii) un injerto de células hematopoyéticas humanas, en donde el animal no humano genéticamente modificado expresa la proteína SIRPα humana y la proteína IL-15 humana; y determinar si el anticuerpo terapéutico candidato o la proteína de unión a antígeno muestra una eficacia mejorada para destruir la célula diana en el animal no humano modificado genéticamente.

En los métodos descritos anteriormente, la célula diana puede ser una o más de una célula tumoral, una célula infectada por virus, una célula infectada por bacterias, una célula bacteriana, una célula fúngica y una célula parásita.

Breve descripción de los dibujos

El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado a color. La oficina proporcionará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos a color previa solicitud y pago de la tarifa necesaria.

En la **figura 1** se proporciona una representación esquemática del reemplazo del gen *SIRPα* de ratón por la secuencia SIRPα humana. En la figura 1 (arriba) se muestra el locus *Sirpα* de ratón que indica la ubicación relativa de los exones 1 a 8. En la figura 1 (abajo) se proporciona una representación esquemática que muestra el alelo diana final con los exones humanos 2 a 4. La proteína química codificada posee una región extracelular correspondiente a los aminoácidos 28 a 362 de la proteína SIRPα humana de tipo silvestre fusionada con la parte intracelular de la proteína SIRPα de ratón. Las formas con rayas diagonales representan una secuencia humana insertada.

En la **figura 2** se proporciona una representación esquemática que ilustra el reemplazo genómico dirigido del gen *IL-15* de ratón como se logró para el ratón 2. Las formas vacías representan una secuencia humana insertada.

En la **figura 3A** se proporcionan gráficos que muestran la expresión del gen *hIL-15* en varios tejidos de ratones SRG no injertados (SIRPα humana, Rag KO, IL-2ry KO) y SRG-15 (SIRPα humana, Rag KO, IL-2ry KO, IL-15 humana (ratón 1)). En el eje de ordenadas se muestra el nivel de ARNm de *hIL-15* en relación con el gen constitutivo *Hprt*.

En la **figura 3B** se proporcionan gráficos que muestran la expresión del gen *hIL-15* humano en varios tejidos de ratones RG no injertados (Rag KO, IL-2ry KO) y SRG-15 no injertados (SIRPα humana, Rag KO, IL-2ry KO, IL-15 humana) (ratón n.º 1 y ratón n.º 2 como se indica).

En la **figura 4** se proporcionan niveles en suero de la proteína IL-15 humana en ratones SRG, SRG IL-15^{h/m} (ratón 2) y SRG IL-15^{h/h} (ratón 2) después de la exposición con poli (I:C).

En la **figura 5A** se proporciona un gráfico que muestra el injerto eficaz de células hematopoyéticas humanas en la sangre de ratones NSG, SRG y SRG-15 (ratón 2) 12 a 14 semanas después del injerto. Todos los datos mostrados son la media ± e.e.m. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de la U de Mann-Whitney bilateral para datos independientes (* P < 0,05, ** P < 0,01, **** P < 0,0001).

En la **figura 5B** se proporcionan gráficos que muestran el número de células CD45+ humanas en la MO, bazo, GL, hígado y pulmón de SRG y SRG-15 (ratón 2) 14 semanas después del injerto.

En la **figura 6A** se proporcionan diagramas que muestran frecuencias de células NK y linfocitos T humanos en ratones SRG y SRG-15 (ratón 1) en la médula ósea (MO), hígado y pulmón.

En la **figura 6B** se proporcionan gráficos que muestran las frecuencias de células NK humanas en ratones SRG y SRG-15 (ratón 1) en varios tejidos.

En la **figura 6C** se proporcionan diagramas y gráficos que ilustran la maduración de células NK humanas en el hígado de ratones SRG y SRG-15 (ratón 1).

En la **figura 6D** se proporcionan gráficos que muestran que las células NK CDS6^{oscuro} CD16⁺ humanas expresan niveles elevados de receptores inhibidores citolíticos humanos en el bazo de ratones SRG-15.

En la **figura 7A** se proporciona un gráfico que muestra la frecuencia de células NK humanas en la sangre de ratones NSG, SRG y SRG-15 (ratón 2) 10 a 12 semanas después del injerto. Todos los datos mostrados son la media $\pm$ e.e.m. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de la U de Mann-Whitney bilateral para datos independientes (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$).

En la **figura 7B** se proporciona un gráfico que muestra el porcentaje de células Nkp46⁺ humanas en el bazo 14 semanas después del injerto para SRG, SRG-15^{h/m} y SRG-15^{h/h}. Todos los datos mostrados son la media $\pm$ e.e.m. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de la U de Mann-Whitney bilateral para datos independientes (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$).

En la **figura 7C** se proporcionan gráficos que muestran la frecuencia de las células NK humanas en la sangre, bazo (B), hígado y pulmón de ratones SRG y SRG-15 (ratón 2) 14 semanas después del injerto. Todos los datos mostrados son la media $\pm$ e.e.m. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de la U de Mann-Whitney bilateral para datos independientes (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$).

En la **figura 7D** se proporcionan gráficos que muestran la frecuencia de células NK humanas en el bazo (B), hígado y pulmón de ratones SRG y SRG-15 (ratón 2) 14 semanas después del injerto. Todos los datos mostrados son la media $\pm$ e.e.m. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de la U de Mann-Whitney bilateral para datos independientes (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$).

En la **figura 8** se proporcionan diagramas (izquierda) que muestran la distribución de linfocitos T y células NK humanas en ratones SRG y SRG-15 (ratón 2) en sangre (clasificadas en células CD45⁺ humanas (células hematopoyéticas) y células Nkp46⁺ (células NK); y un gráfico (derecha) que muestra el porcentaje de células hCD45⁺ que son células Nkp46⁺ en la sangre de ratones SRG-15 injertados.

En la **figura 9A** se proporcionan diagramas que muestran la distribución de células NK y linfocitos T en el bazo y gráficos que muestran el porcentaje y el número de células Nkp46⁺ en el bazo de ratones SRG-15 (ratón 2) injertados con huHSC CD34⁺ en relación con ratones SRG injertados con huHSC CD34⁺.

En la **figura 9B** se proporciona un gráfico que muestra la composición de células inmunitarias humanas en la sangre de ratones NSG (n = 5), SRG (n = 19) y SRG-15 (ratón 2) (n = 39) 10 a 12 semanas después del injerto.

En la **figura 9C** se proporcionan la cantidad de células CD45⁺ humanas en el timo de ratones SRG y SRG-15 (ratón 2) 14 semanas después del injerto.

En la **figura 9D** se proporcionan diagramas de citometría de flujo representativos de células hCD45⁺ en el timo de un ratón SRG y SRG-15 (ratón 2).

En la **figura 9E** se proporciona un gráfico que muestra la composición de células hCD45⁺ en el timo de ratones SRG (n = 8) y SRG-15 (ratón 2) (n = 4) 14 semanas después del injerto.

En la **figura 10A** se proporcionan diagramas que muestran la frecuencia de los subconjuntos de células NK CD56^{brillante} CD16⁻ y CD56^{oscuro} CD16⁺ en la sangre y el bazo de ratones SRG y SRG-15 (ratón 2) siete semanas después del injerto.

En la **figura 10B** se proporcionan gráficos que muestran la frecuencia de subconjuntos de células NK CDS6^{brillante} CD16⁻ y CD56^{oscuro} CD16⁺ en la sangre y el bazo de ratones SRG y SRG-15 (ratón 2) siete semanas después del injerto.

En la **figura 10C** se proporciona diagramas y gráficos que muestran la expresión de los receptores inhibidores citolíticos (KIR, del inglés *killer inhibitory receptors*) en subconjuntos de células NK en seres humanos y ratones SRG-15 (ratón 2).

En la **figura 11** se proporcionan dos diagramas (arriba a la izquierda y arriba a la derecha) que muestran la distribución de células NK CD16⁺ frente a CD16⁻ en la sangre de ratones SRG-15 (ratón 2) en relación con una muestra de PBMC. En la figura 11 también se proporciona un gráfico (abajo) que muestra el porcentaje de células Nkp46⁺ que son CD16⁺ frente a CD16⁻ en sangre obtenida de ratones SRG-15 (ratón 2) o una muestra procedente de PBMC.

En la **figura 12** se proporcionan gráficos que muestran el desarrollo de células NK humanas en la médula ósea de ratones SRG y SRG-15 (ratón 2) siete semanas después del injerto. Todos los datos mostrados son la media $\pm$ e.e.m. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de la U de Mann-Whitney bilateral para datos independientes (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$).

En la **figura 13A** se proporcionan gráficos que muestran frecuencias de linfocitos T humanos en ratones SRG y SRG-15 (ratón 1) en varios tejidos. (K/ μ l = miles de células por μ l).

En la **figura 13B** se proporcionan diagramas y gráficos que muestran el fenotipo de linfocitos T CD8⁺ humanos en sangre e hígado para ratones SRG y SRG-15 (ratón 1).

En la **figura 14A** se proporciona diagramas y un gráfico que muestran la expresión del marcador CD69 residente en tejido en linfocitos T CD8⁺ de pulmón de ratones SRG y SRG-15 (ratón 1).

En la **figura 14B** se proporcionan un diagrama y un gráfico que muestran la expresión del marcador CD69 residente en tejido en los linfocitos T CD8⁺ de hígado de ratones SRG y SRG-15 (ratón 1).

En la **figura 15A** se proporcionan gráficos que muestran la frecuencia de linfocitos T hCD3⁺ en el bazo, pulmón e hígado de ratones SRG y SRG-15 (ratón 2) 16 semanas después del injerto.

En la **figura 15B** se proporcionan gráficos que muestran la relación CD4/CD8 en el bazo, pulmón e hígado de

ratones SRG y SRG-15 (ratón 2) 16 semanas después del injerto.

En la **figura 16A** se proporcionan diagramas que ilustran la frecuencia de linfocitos de la lámina propia (LLP) humanos en el colon de ratones SRG y SRG-15 (ratón 1).

En la **figura 16B** se proporcionan gráficos que ilustran la frecuencia de linfocitos de la lámina propia (LLP) humanos en el colon de ratones SRG y SRG-15 (ratón 1).

En la **figura 17A**, junto con las figuras 17B y 17C, se ilustra el injerto eficaz de linfocitos intraepiteliales (LIE) humanos en el intestino delgado de ratones SRG-15 de 16 semanas de edad (ratón 1). En la figura 17A se proporcionan diagramas y gráficos que muestran células CD45⁺ y linfocitos T CD8⁺ humanos en de la fracción de LIE de ratones SRG y SRG-15 (ratón 1).

En la **figura 17B** se proporcionan imágenes de tinción inmunohistoquímica de hCD45 en el intestino delgado de ratones SRG y SRG-15 (ratón 1) de 16 semanas.

En la **figura 17C** se proporcionan diagramas que muestran las características fenotípicas de los linfocitos T CD8⁺ humanos en el bazo y el intestino delgado de ratones SRG-15 (ratón 1).

En la **figura 18A** se proporcionan diagramas de FACS representativos que muestran células CD45⁺ humanas y de ratón en de la fracción de LIE de ratones SRG y SRG-15 (ratón 2) 16 semanas después del injerto.

En la **figura 18B** se proporcionan gráficos que muestran el número de LIE humanos en el intestino delgado de ratones SRG en relación con ratones SRG-15 (ratón 2) y el número de LLP humanos en el intestino grueso de ratones SRG grueso en relación con ratones SRG-15 (ratón 2). Todos los datos mostrados son la media $\pm$ e.e.m. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de la U de Mann-Whitney bilateral para datos independientes (***) $P < 0,001$.

En la **figura 18C** se proporciona un diagrama que muestra la composición de células hCD3⁺ en el intestino delgado de ratones SRG-15 (ratón 2). Un diagrama FACS representativo de ocho ratones SRG-15 (ratón 2).

En la **figura 18D** se proporcionan gráficos que muestran las características fenotípicas de los linfocitos T hCD3⁺ hCD8⁺ en el bazo y el intestino delgado de ratones SRG-15 (ratón 2).

En la **figura 18E** se proporcionan imágenes de tinción inmunohistoquímica de hCD8 en el intestino delgado de ratones SRG y SRG-15 (ratón 2). Las flechas indican LIE hCD8⁺. Las imágenes son representativas de tres ratones por grupo.

En la **figura 19A** se proporcionan diagramas y gráficos que muestran la distribución y el número de células hCD45⁺ en las poblaciones de linfocitos intraepiteliales de ratones SRG y SRG-15 y los porcentajes relativos de células NK y linfocitos T en las poblaciones de células hCD45⁺ en las poblaciones de linfocitos intraepiteliales de ratones SRG y SRG-15 (ratón 2).

En la **figura 19B** se proporcionan diagramas y gráficos que muestran la distribución y el porcentaje de células NK CD16⁺ y CD16⁻ en linfocitos intraepiteliales de ratones SRG-15 (ratón 2) en comparación con la sangre y el bazo.

En la **figura 19C** se proporcionan diagramas y gráficos que muestran la distribución y el número de LIE humanos y linfocitos de la lámina propia (LLP) humanos en ratones SRG y SRG-15 (ratón 2).

En las **figuras 20A y 20B** se proporcionan diagramas y gráficos que demuestran la presencia de placas de Peyer discernibles que contienen predominantemente células hCD45⁺ en ratones SRG-15 (ratón 2).

En la **figura 21A** se proporciona un cronograma para la convivencia y la recogida de muestras de heces para la secuenciación de la microbiota intestinal.

En la **figura 21B** se proporciona un diagrama que muestra la abundancia relativa de bacterias de ratón en el intestino de ratones SRG y SRG-15 (ratón 1) no injertados e injertados.

En la **figura 22** se ilustra la relevancia funcional de los linfocitos T residentes en tejidos humanos en ratones SRG-15. De manera más específica, en la figura 22 se proporciona un gráfico que demuestra la relevancia funcional de los LIE humanos para eliminar la infección aguda por rotavirus.

En la **figura 23A** se proporcionan diagramas ViSNE que muestran análisis basados en CyTOF de 42 parámetros de subconjuntos de células NK CD56^{brillante} CD16⁻ y CDS6^{oscuro} CD16⁺ en seres humanos (n = 20) y ratones SRG-15 (ratón 2) (n = 9). Cada punto representa una sola célula.

En la **figura 23B** se proporcionan diagramas ViSNE que muestran la intensidad de expresión de ocho marcadores seleccionados en células NK CDS6^{brillante} CD16⁻ en seres humanos (n = 20) y ratones SRG-15 (ratón 2) (n = 9).

En los diagramas ViSNE de la **figura 23C** se muestra la intensidad de expresión de ocho marcadores seleccionados en células NK CD56^{oscuro} CD16⁺ en seres humanos (n = 20) y ratones SRG-15 (n = 9).

En la **figura 24A** se proporciona un gráfico que muestra el porcentaje de células NK en sangre en ratones SRG frente a SRG-15 (ratón 2) que son CD69⁺ antes y después de la inyección de poli-IC.

En la **figura 24B** se proporcionan gráficos que muestran la producción de IFN γ a partir de células NK procedentes de SRG y SRG-15 (ratón 2) después la estimulación *in vitro* con poli I:C o IL-12p70 humana. Las células NK de ratones se comparan con las células NK procedentes de PBMC humanas sanas. Todas las muestras están normalizadas para el número de NK.

En la **figura 24C** se proporcionan gráficos que muestran la capacidad citolítica de las células NK esplénicas de ratones SRG y SRG-15 (ratón 2) frente a células K562 deficientes en HLA de clase I (izquierda) o frente a células Raji en ausencia (arriba a la derecha) o en presencia (abajo a la derecha) del anticuerpo anti-CD20. SRG-15 n.º 1 y SRG-15 n.º 2 representan dos preparaciones diferentes de células NK de compañeros de camada SRG-15 (ratón 2).

En la **figura 25A** se proporciona un gráfico que muestra que las células NK humanas en ratones SRG-15 (ratón 2) inhiben el crecimiento tumoral después del tratamiento con rituximab (RTX). Todos los datos mostrados son la media $\pm$ e.e.m. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de la U de Mann-Whitney bilateral para datos independientes (***) $P < 0,001$.

En la **figura 25B** se proporcionan diagramas y un gráfico que muestran la frecuencia de células NK y linfocitos T humanos en xenoinjertos de tumores humanos de ratones SRG-15 no tratados ($n = 5$) y tratados con RTX ($n = 1$). Todos los datos mostrados son la media $\pm$ e.e.m. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de la U de Mann-Whitney bilateral para datos independientes (** $P < 0,001$).

En la **figura 25C** se proporcionan diagramas y gráficos que muestran subconjuntos de células NK humanas en la sangre y el tumor de ratones SRG-15 no tratados ($n = 2$) y tratados con RTX ($n = 1$). Todos los datos mostrados son la media $\pm$ e.e.m. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de la U de Mann-Whitney bilateral para datos independientes (** $P < 0,001$).

Descripción detallada

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los que se describen en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación, se describen métodos y materiales particulares. Se entiende que la presente divulgación reemplaza cualquier divulgación de una publicación incorporada en la medida en que exista una contradicción.

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

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

Las publicaciones analizadas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. No ha de interpretarse que nada en el presente documento constituya una admisión de que la presente invención no tenga derecho a anteponer dicha publicación.

Se proporcionan ratones genéticamente modificados que expresan SIRP α humana e IL-15 humana del genoma del ratón. También se divulgan métodos para hacer ratones que expresan SIRP α humana e IL-15 humana a partir del genoma de ratón, y métodos para utilizar los ratones que expresan SIRP α humana e IL-15 humana a partir del genoma de ratón. Estos animales y métodos encuentran muchos usos en la materia, incluidos, por ejemplo, en el modelado del desarrollo y la función de linfocitos citolíticos naturales (NK) y/o linfocitos T humanos; en el modelado de infección por patógenos humanos, por ejemplo, infección por patógenos humanos de tejidos específicos, por ejemplo, infección por patógenos humanos intestinales, pulmonares o hepáticos; en el modelado de la infección por patógenos humanos de células NK y/o linfocitos T humanos; en la selección *in vivo* de agentes que inhiben la infección por un patógeno que activa, induce y/o se dirige a linfocitos T y/o células NK; en la selección *in vivo* de agentes que modulan el desarrollo y/o la función de células NK y/o linfocitos T humanos, por ejemplo, en un estado sano o enfermo; en la selección *in vivo* de agentes que son tóxicos para las células NK y/o linfocitos T humanos; en la selección *in vivo* de agentes que evitan, mitigan o revierten los efectos tóxicos de los agentes tóxicos en las células NK y/o linfocitos T humanos; en la selección *in vivo* de vacunas candidatas inductoras de linfocitos T; y en la selección *in vivo* e *in vitro* de agentes que inhiben el crecimiento tumoral y/o la infección mediante la activación de procesos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediados por células NK.

ANIMALES NO HUMANOS SIRP α HUMANIZADOS

En la presente invención se proporciona un ratón SIRP α humanizado. Por un animal no humano SIRP α humanizado, o "ratón SIRP α ", se entiende un ratón que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína SIRP α humana. Como se utiliza en el presente documento, "proteína SIRP α humana" significa una proteína que es una proteína SIRP α humana de tipo silvestre (o nativa) o una variante de una proteína SIRP α humana de tipo silvestre (o nativa), que conserva una o más funciones de señalización y/o de receptor de una proteína SIRP α humana de tipo silvestre. Como se utiliza en el presente documento, el término "variante" define un mutante genético aislado de origen natural de un polipéptido o una secuencia de ácido nucleico humanos o una variación preparada de forma recombinante de un polipéptido o una secuencia de ácido nucleico humanos, cada uno de los cuales contiene una o más mutaciones en comparación con la correspondiente secuencia de ácido nucleico o polipéptido humanos de tipo silvestre. Por ejemplo, dichas mutaciones pueden ser una o más sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos. El término "variante" también incluye homólogos y ortólogos humanos. En algunas realizaciones, un polipéptido variante de la presente invención tiene el 70 % o más de identidad, por ejemplo, el 75 %, el 80 %, o el 85 % o más de identidad con un polipéptido humano de tipo silvestre, por ejemplo, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad con un polipéptido humano de tipo silvestre.

- El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar con cualquier técnica conveniente en la materia, por ejemplo, el alineamiento de las secuencias con, por ejemplo, un programa informático disponible públicamente. Las mutaciones se pueden introducir mediante técnicas convencionales de biología molecular, tales como
- 5 mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis mediada por PCR, evolución dirigida y similares. Un experto en la materia reconocerá que se pueden introducir una o más sustituciones de ácidos nucleicos sin alterar la secuencia de aminoácidos, y que se pueden introducir una o más mutaciones de aminoácidos sin alterar las propiedades funcionales de la proteína humana.
- 10 Se pueden realizar sustituciones conservadoras de aminoácidos en proteínas humanas para producir variantes de proteínas humanas. Por sustituciones conservadoras de aminoácidos se entienden sustituciones reconocidas en la materia de un aminoácido por otro aminoácido que tiene características similares. Por ejemplo, cada aminoácido puede describirse como poseedor de una o más de las siguientes características: electropositivo, electronegativo, alifático, aromático, polar, hidrófobo e hidrófilo. Una sustitución conservadora es una sustitución de un aminoácido que
- 15 tiene una característica estructural o funcional específica por otro aminoácido que tiene la misma característica. Los aminoácidos ácidos incluyen aspartato y glutamato; los aminoácidos básicos incluyen histidina, lisina y arginina; los aminoácidos alifáticos incluyen isoleucina, leucina y valina; los aminoácidos aromáticos incluyen fenilalanina, glicina, tirosina y triptófano; los aminoácidos polares incluyen aspartato, glutamato, histidina, lisina, asparagina, glutamina, arginina, serina, treonina y tirosina; y los aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, cisteína, fenilalanina, glicina,
- 20 isoleucina, leucina, metionina, prolina, valina y triptófano; y las sustituciones conservadoras incluyen la sustitución entre aminoácidos dentro de cada grupo. Los aminoácidos también se pueden describir en términos de tamaño relativo, alanina, cisteína, aspartato, glicina, asparagina, prolina, treonina, serina, valina, todos normalmente considerados pequeños.
- 25 Las variantes humanas pueden incluir análogos de aminoácidos sintéticos, derivados de aminoácidos y/o aminoácidos no convencionales, incluidos de manera ilustrativa, aunque no de forma limitativa, ácido α -aminobutírico, citrulina, canavanina, cianoalanina, ácido diaminobutírico, ácido diaminopimélico, dihidroxifenilalanina, ácido djenkólico, homoarginina, hidroxiprolina, norleucina, norvalina, 3-fosfoserina, homoserina, 5-hidroxitriptófano, 1-metilhistidina, metilhistidina y ornitina.
- 30 Las variantes humanas normalmente estarán codificadas por ácidos nucleicos que tienen un elevado grado de identidad con un ácido nucleico que codifica la proteína humana de tipo silvestre. El complemento de un ácido nucleico que codifica una variante humana se hibrida específicamente con un ácido nucleico que codifica una humana de tipo silvestre en condiciones de elevada rigurosidad. Los ácidos nucleicos que codifican una variante humana se pueden
- 35 aislar o generar de forma recombinante o sintética con una metodología bien conocida. La expresión "proteína SIRP α humana" también abarca fragmentos de una proteína SIRP α humana de tipo silvestre (o una variante de la misma), que conservan una o más funciones de señalización y/o de receptor de una proteína SIRP α humana de tipo silvestre, por ejemplo, un dominio extracelular de una proteína SIRP α humana.
- 40 La expresión "proteína SIRP α humana" también abarca proteínas de fusión, es decir, proteínas quiméricas, que incluyen uno o más fragmentos de una proteína SIRP α humana de tipo silvestre (o una variante de la misma) y que conservan una o más funciones de señalización y/o de receptor de una proteína SIRP α humana de tipo silvestre. Una proteína de fusión que incluye uno o más fragmentos de una proteína SIRP α humana de tipo silvestre (o una variante de la misma), por ejemplo, en combinación con uno o más péptidos o polipéptidos no humanos, también puede
- 45 denominarse en el presente documento proteína SIRP α humanizada. Por lo tanto, por ejemplo, una proteína que incluye una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular de una proteína SIRP α humana de tipo silvestre fusionada con un dominio de señalización de una proteína SIRP α de ratón de tipo silvestre está abarcada por el término "proteína SIRP α humana".
- 50 En algunos casos, una proteína SIRP α humana de acuerdo con la presente divulgación incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o el 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 28 a 362 de la SEQ ID NO: 12.
- 55 Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína SIRP α humana es, por lo tanto, un polinucleótido que incluye una secuencia codificante para una proteína SIRP α humana, por ejemplo, una proteína SIRP α humana de tipo silvestre, una variante de una proteína SIRP α humana de tipo silvestre, un fragmento de una proteína SIRP α humana de tipo silvestre (o una variante de la misma) que conserva una o más funciones de señalización y/o de receptor de
- 60 una proteína SIRP α humana de tipo silvestre, o proteínas de fusión, es decir, proteínas quiméricas, que incluyen uno o más fragmentos de una proteína SIRP α humana de tipo silvestre (o una variante de la misma) y que conservan una o más funciones de señalización y/o de receptor de una proteína SIRP α humana de tipo silvestre.
- 65 SIRP α (también conocida como "proteína reguladora de señales α " y "CD172A" en seres humanos) es un miembro de la familia de proteínas reguladoras de señales (SIRP, del inglés *signal-regulatory-protein*) y también pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se ha demostrado que SIRP α mejora el injerto celular en ratones

inmunodeficientes (Strowig *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108:13218-13223). La secuencia polipeptídica para SIRP α humana de tipo silvestre y la secuencia de ácido nucleico que codifica SIRP α humana de tipo silvestre se pueden encontrar en Genbank con los números de registro NM_001040022.1 (variante 1), NM_001040023.1 (variante 2) y NM_080792.2 (variante 3). El gen *SIRP α* se conserva en al menos el chimpancé, macaco de la India, perro, vaca, ratón, rata y pollo. El locus genómico que codifica la proteína SIRP α humana de tipo silvestre se puede encontrar en el genoma humano en el cromosoma 20; NC_000020.11 (1894117-1939896). La secuencia de proteínas está codificada por los exones 1 a 8 en este locus. De esta manera, en algunas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico que incluye la secuencia codificante para SIRP α humana incluye uno o más de los exones 1 a 8 del gen *SIRP α* humano. En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico también incluye aspectos del locus genómico de la SIRP α humana, por ejemplo, intrones, secuencia no traducida (UTR, del inglés *untranslated*) en 3' y/o 5'. En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico incluye regiones enteras del locus genómico SIRP α humano. En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico incluye los exones 2 a 4 del locus genómico SIRP α humano.

En los ratones SIRP α humanizados de la presente solicitud, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína SIRP α humana puede estar unida operativamente a una o más secuencias reguladoras de un gen *SIRP α* , por ejemplo, una secuencia reguladora de un gen *SIRP α* del animal no humano. Las secuencias reguladoras de SIRP α de animales no humanos, por ejemplo, de ratón, son aquellas secuencias del locus genómico SIRP α de animales no humanos que regulan la expresión de SIRP α de animales no humanos, por ejemplo, las secuencias reguladoras en 5', por ejemplo, el promotor SIRP α , una región no traducida (UTR) en 5' de SIRP α , etc.; las secuencias reguladoras en 3', por ejemplo, la 3'-UTR; y potenciadores, etc.

Un "promotor" o "secuencia promotora" se refiere a una región reguladora de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante cadena abajo (dirección 3'). La secuencia promotora está limitada en su extremo 3' por el sitio de inicio de la transcripción y se extiende cadena arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción, así como dominios de unión a proteínas responsables de la unión de la ARN polimerasa. Los promotores eucariotas a menudo, pero no siempre, contienen cajas "TATA" y cajas "CAT". De particular interés para la presente divulgación son los elementos reguladores del ADN, por ejemplo, promotores, que promueven la transcripción de la proteína humana en el mismo patrón de expresión espacial y temporal, es decir, en las mismas células y tejidos y en los mismos tiempos, como se observaría para la correspondiente proteína endógena.

La SIRP α murina se encuentra en el cromosoma 2; NC 000068.7 (129592606-129632228), y la secuencia de codificación de SIRP α murina se puede encontrar en Genbank con los n.º de registro NM_007547.4 (isoforma 1), NM_001177647.2 (isoforma 2), NM_001291019.1 (isoforma 3), NM_001291020.1 (isoforma 3), NM_001291021.1 (isoforma 4), NM_001291022.1 (isoforma 5). Las secuencias reguladoras de la SIRP α murina están bien definidas en la materia y pueden identificarse fácilmente mediante métodos informáticos, por ejemplo, haciendo referencia a los números de registro de Genbank anteriores en el UCSC Genome Browser en la red mundial, o mediante métodos experimentales como se describe en la materia. En algunos casos, por ejemplo, cuando la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína SIRP α humana se localiza en el locus genómico SIRP α de ratón, las secuencias reguladoras unidas operativamente a la secuencia codificante SIRP α humana son endógenas, o nativas, del genoma de ratón, es decir, se presentaron en el genoma de ratón antes de la integración de las secuencias de ácido nucleico humanas.

En algunos casos, el animal no humano SIRP α humanizado, por ejemplo, ratón, se genera mediante la integración aleatoria, o inserción, de una secuencia de ácido nucleico humano que codifica una proteína SIRP α humana (incluidos los fragmentos descritos anteriormente), es decir, una "secuencia de ácido nucleico de SIRP α humana", o "secuencia SIRP α humana", en el genoma. Normalmente, la localización de la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína SIRP α humana en el genoma es desconocida. En otros casos, el animal no humano SIRP α humanizado se genera mediante la integración dirigida, o inserción, de la secuencia de ácido nucleico de SIRP α humana en el genoma, mediante, por ejemplo, recombinación homóloga. En la recombinación homóloga, un polinucleótido se inserta en el genoma hospedador en un locus diana mientras, simultáneamente, se elimina material genómico hospedador, por ejemplo, 50 pares de bases (pb) o más, 100 pb o más, 200 pb o más, 500 pb o más, 1 kb o más, 2 kb o más, 5 kb o más, 10 kb o más, 15 kb o más, 20 kb o más, o 50 kb o más de material genómico, a partir del locus diana. Así, por ejemplo, en un ratón SIRP α humanizado que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína SIRP α humana creada mediante el direccionamiento de la secuencia de ácido nucleico de SIRP α humana al locus SIRP α de ratón, la secuencia de ácido nucleico de SIRP α humana puede reemplazar algunas o todas las secuencias de ratón, por ejemplo, exones y/o intrones, en el locus SIRP α . En algunos de dichos casos, una secuencia de ácido nucleico de SIRP α humana se integra en el locus de SIRP α de ratón de tal manera que la expresión de la secuencia de SIRP α humana está regulada por las secuencia reguladoras nativas, o endógenas, en el locus SIRP α de ratón. En otras palabras, la(s) secuencia(s) reguladora(s) a la(s) que la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína SIRP α humana está unida operativamente son las secuencias reguladoras de SIRP α nativas en el locus SIRP α de ratón.

En algunos casos, la integración de la secuencia de SIRP α humana no afecta la transcripción del gen en el que se ha integrado la secuencia de SIRP α humana. Por ejemplo, si la secuencia de SIRP α humana se integra en una secuencia codificante como una inteiña, o la secuencia de SIRP α humana incluye un péptido 2A, la secuencia de SIRP α humana se transcribirá y traducirá simultáneamente con el gen en el que se ha integrado la secuencia de SIRP α humana. En

otros casos, la integración de la secuencia de SIRPα humana interrumpe la transcripción del gen en el que se ha integrado la secuencia de SIRPα humana. Por ejemplo, tras la integración de la secuencia de SIRPα humana mediante recombinación homóloga, se puede eliminar parte o la totalidad de la secuencia codificante en el locus de integración, de modo que la secuencia de SIRPα humana se transcribe en su lugar. En algunos de dichos casos, la integración de una secuencia de SIRPα humana crea una mutación anuladora y, por lo tanto, un alelo nulo. Un alelo nulo es una copia mutante de un gen que carece por completo de la función normal de ese gen. Esto puede ser el resultado de la ausencia completa del producto génico (proteína, ARN) a nivel molecular, o la expresión de un producto génico no funcional. En el nivel fenotípico, un alelo nulo es indistinguible de una eliminación del locus completo.

En algunos casos, el ratón SIRPα humanizado, por ejemplo, ratón, incluye una copia de la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína SIRPα humana. Por ejemplo, el ratón puede ser heterocigoto para la secuencia de ácido nucleico. En otras palabras, un alelo en un locus puede incluir la secuencia de ácido nucleico, mientras que el otro puede ser el alelo endógeno. Por ejemplo, como se ha comentado anteriormente, en algunos casos, una secuencia de ácido nucleico de SIRPα humana se integra en el locus de SIRPα de ratón de tal manera que crea un alelo nulo para el ratón SIRPα. El ratón SIRPα humanizado puede ser heterocigoto para la secuencia de ácido nucleico que codifica la SIRPα humana, es decir, el ratón SIRPα humanizado incluye un alelo nulo para la SIRPα de animal no humano (el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico) y un alelo SIRPα endógeno (de tipo silvestre o de otro tipo). En otras palabras, el ratón puede ser un ratón SIRPα h/m, donde "h" representa el alelo que incluye la secuencia humana y "m" representa el alelo endógeno. En otros casos, el SIRPα humanizado incluye dos copias de la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína SIRPα humana. Por ejemplo, el ratón puede ser homocigoto para la secuencia de ácido nucleico, es decir, ambos alelos para un locus en el genoma diploide incluirán la secuencia de ácido nucleico, es decir, el ratón SIRPα humanizado incluye dos alelos nulos para el SIRPα de ratón (el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico). En otras palabras, el ratón puede ser un ratón SIRPα ^{h/h}.

El ratón SIRPα humanizado incluye otras modificaciones genéticas. En la presente invención, el ratón SIRPα humanizado es un animal inmunodeprimido. Por ejemplo, el ratón SIRPα humanizado puede incluir al menos un alelo nulo para el gen *Rag2* ("gen 2 activador de la recombinación", en donde la secuencia codificante para el gen de ratón se puede encontrar con el número de registro de Genbank NM_009020.3). En algunas realizaciones, el ratón SIRPα humanizado incluye dos alelos nulos para *Rag2*. En otras palabras, el ratón SIRPα humanizado puede ser homocigoto nulo para *Rag2*. Como otro ejemplo, el SIRPα humanizado puede incluir al menos un alelo nulo para el gen *IL2ry* ("receptor de interleucina 2 γ", también conocido como cadena γ común, o γC, en donde la secuencia codificante para el gen de ratón se puede encontrar con el número de registro de Genbank NM_013563.3). En algunas realizaciones, el ratón SIRPα humanizado incluye dos alelos nulos para *IL2ry*. En otras palabras, el ratón SIRPα humanizado es homocigoto nulo para *IL2ry*, es decir, es *IL2ry*^{-/-} (o *IL2ry*^{γ/-} donde el gen *IL2ry* se encuentra en el cromosoma X como en el ratón). En algunas realizaciones, el ratón SIRPα incluye un alelo nulo para *Rag2* e *IL2ry*, es decir, es *Rag2*^{-/-} *IL2ry*^{-/-} (o *Rag2*^{-/-} *IL2ry*^{γ/-} donde el gen *IL2ry* se encuentra en el cromosoma X como en el ratón). También se contemplan otras modificaciones genéticas. Por ejemplo, el ratón SIRPα humanizado puede incluir modificaciones en otros genes asociados con el desarrollo y/o función de las células hematopoyéticas y el sistema inmunitario, por ejemplo, el reemplazo de uno u más de otros genes de ratón por una secuencia de ácido nucleico que codifica el ortólogo humano. De manera adicional o como alternativa, el ratón SIRPα humanizado puede incluir modificaciones en genes asociados con el desarrollo y/o función de otras células y tejidos, por ejemplo, genes asociados con trastornos o enfermedades humanas, o genes que, cuando se modifican en ratones, proporcionan modelos de trastornos o enfermedades humanas.

ANIMALES NO HUMANOS IL-15 HUMANIZADOS

En la presente divulgación, se proporciona un ratón IL-15 humanizado. Por un ratón IL-15 humanizado, o "ratón IL-15", se entiende un ratón que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de IL-15 humana. Como se utiliza en el presente documento, "proteína IL-15 humana" significa una proteína que es una proteína IL-15 humana de tipo silvestre (o nativa) o una variante de una proteína IL-15 humana de tipo silvestre (o nativa), que conserva una o más funciones de señalización de una proteína IL-15 humana de tipo silvestre (o nativa), por ejemplo, que permite la estimulación de (o la señalización a través de) el receptor de IL-15 humana, y/o que es capaz de unirse a la subunidad alfa del receptor de IL-15 humana del receptor de IL-15 humana, y/o que es capaz de unirse a IL-2Rβ/IL-15R β y la cadena γ común (γc). La expresión "proteína IL-15 humana" también abarca fragmentos de una proteína IL-15 humana de tipo silvestre (o variantes de la misma), que conservan una o más funciones de señalización de una proteína IL-15 humana de tipo silvestre, por ejemplo, un fragmento de una proteína IL-15 humana, que permite la estimulación de (o la señalización a través de) el receptor de IL-15 humana, y/o que es capaz de unirse a la subunidad alfa del receptor de IL-15 humana del receptor de IL-15 humana, y/o que es capaz de unirse a IL-2Rβ/IL-15R β y la cadena γ común (γc).

La expresión "proteína IL-15 humana" también abarca proteínas de fusión, es decir, proteínas quiméricas, que incluyen uno o más fragmentos de una proteína IL-15 humana de tipo silvestre (o una variante de la misma) y que conservan una o más funciones de señalización de una proteína IL-15 humana de tipo silvestre, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Una proteína de fusión que incluye uno o más fragmentos de una proteína IL-15 humana de tipo silvestre (o una variante de la misma) también puede denominarse en el presente documento proteína IL-15 humanizada.

Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína IL-15 humana es, por lo tanto, un polinucleótido que incluye una secuencia codificante para una proteína IL-15 humana, es decir, una proteína IL-15 humana de tipo silvestre, una variante de una proteína IL-15 humana de tipo silvestre, un fragmento de una proteína IL-15 humana de tipo silvestre (o una variante de la misma) que conserva una o más funciones de señalización de una proteína IL-15 humana de tipo silvestre, o proteínas de fusión, es decir, proteínas quiméricas, que incluyen uno o más fragmentos de una proteína IL-15 humana de tipo silvestre (o una variante de la misma) y que conservan una o más funciones de señalización de una proteína IL-15 humana de tipo silvestre, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente.

IL-15 (también conocida como "Interleucina 15") es una citocina que estimula la proliferación de linfocitos T. La secuencia polipeptídica para la IL-15 humana de tipo silvestre y la secuencia de ácido nucleico que codifica la IL-15 humana de tipo silvestre se pueden encontrar Genbank con los números de registro NM_000585.4; NP_000576.1 (isoforma 1), NM_172175.2; NP_751915.1 (isoforma 2). El locus genómico que codifica la proteína IL-15 humana de tipo silvestre se puede encontrar en el genoma humano en el cromosoma 4; NC_000004.12 (141636596-141733987). El locus IL-15 humano incluye 8 exones, siendo los exones 3 a 8 exones de codificación. De esta manera, en algunas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico que incluye la secuencia codificante de la IL-15 humana incluye uno o más de los exones 3 a 8 del gen *IL-15* humano (es decir, los exones de codificación 1 a 6, véase la figura 2). Por ejemplo, se han identificado varias isoformas de ARNm de IL-15 que se producen a través de las siguientes combinaciones de uso de exones Exones 1-2-3-4-5-6-7-8; Exones 1-3-4-5-6-7-8 o Exones 1-3-4-(exón alternativo 5)-5-6-7-8). En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico también incluye aspectos del locus genómico de la IL-15 humana, por ejemplo, intrones, secuencia no traducida (UTR) en 3' y/o 5'. En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico incluye regiones enteras del locus genómico IL-15 humano. En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico incluye los exones 5 a 8 del locus genómico IL-15 humano (es decir, codifica los exones 3 a 6).

En algunos casos, una proteína IL-15 humana de acuerdo con la presente divulgación incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o el 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 31.

En los ratones IL-15 humanizados de la presente solicitud, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de IL-15 humana está unida operativamente a una o más secuencias reguladoras de un gen *IL-15*, por ejemplo, una secuencia reguladora de un gen *IL-15* del ratón. Las secuencias reguladoras de IL-15 de ratón son aquellas secuencias del locus genómico de IL-15 de ratón que regulan la expresión de IL-15 de ratón, por ejemplo, las secuencias reguladoras en 5', por ejemplo, el promotor de IL-15, una región no traducida (UTR) en 5' de IL-15, etc.; las secuencias reguladoras en 3', por ejemplo, la 3'-UTR; y potenciadores, etc. IL-15 de ratón se encuentra en el cromosoma 8, NC_000074.6 (82331624-82403227, complemento), y la secuencia codificante de IL-15 de ratón puede encontrarse en Genbank con los números de registro NM_008357.2 (variante 1); NM_001254747.1 (variante 2). Las secuencias reguladoras de IL-15 murina están bien definidas en la materia y pueden identificarse fácilmente mediante métodos informáticos, por ejemplo, haciendo referencia a los números de registro de Genbank anteriores en el navegador UCSC Genome, en la web mundial en genome.ucsc.edu, o mediante métodos experimentales como se describe en la materia. En algunos casos, por ejemplo, cuando la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína IL-15 humana se localiza en el locus genómico IL-15 de ratón, las secuencias reguladoras unidas operativamente a la secuencia codificante IL-15 humana son endógenas, o nativas, del genoma de ratón, es decir, se presentaron en el genoma de ratón antes de la integración de las secuencias de ácido nucleico humanas.

En algunos casos, el animal no humano IL-15 humanizado, por ejemplo, ratón, se genera mediante la integración aleatoria, o inserción, de una secuencia de ácido nucleico humano que codifica una proteína IL-15 humana (incluidos los fragmentos descritos anteriormente), es decir, una "secuencia de ácido nucleico de IL-15 humana", o "secuencia IL-15 humana", en el genoma. Normalmente, la localización de la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína IL-15 humana en el genoma es desconocida. En otros casos, el animal no humano IL-15 humanizado se genera mediante la integración dirigida, o inserción, de la secuencia de ácido nucleico de IL-15 humana en el genoma, mediante, por ejemplo, recombinación homóloga. En la recombinación homóloga, un polinucleótido se inserta en el genoma hospedador en un locus diana mientras, simultáneamente, se elimina material genómico hospedador, por ejemplo, 50 pares de bases (pb) o más, 100 pb o más, 200 pb o más, 500 pb o más, 1 kb o más, 2 kb o más, 5 kb o más, 10 kb o más, 15 kb o más, 20 kb o más, o 50 kb o más de material genómico, a partir del locus diana. Así, por ejemplo, en un ratón IL-15 humanizado que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína IL-15 humana creada mediante el direccionamiento de la secuencia de ácido nucleico de IL-15 humana al locus de IL-15 de ratón, la secuencia de ácido nucleico de IL-15 humana puede reemplazar algunas o todas las secuencias de ratón, por ejemplo, exones y/o intrones, en el locus IL-15. En algunos de dichos casos, una secuencia de ácido nucleico de IL-15 humana se integra en el locus de IL-15 de ratón de tal manera que la expresión de la secuencia de IL-15 humana está regulada por las secuencias reguladoras nativas, o endógenas, en el locus IL-15 de ratón. En otras palabras, la(s) secuencia(s) reguladora(s) a la(s) que la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína IL-15 humana está unida operativamente son las secuencias reguladoras de IL-15 nativas en el locus IL-15 de ratón.

En algunos casos, la integración de la secuencia de IL-15 humana no afecta la transcripción del gen en el que se ha

integrado la secuencia de IL-15 humana. Por ejemplo, si la secuencia de IL-15 humana se integra en una secuencia codificante como una inteína, o la secuencia de IL-15 humana incluye un péptido 2A, la secuencia de IL-15 humana se transcribirá y traducirá simultáneamente con el gen en el que se ha integrado la secuencia de IL-15 humana. En otros casos, la integración de la secuencia de IL-15 humana interrumpe la transcripción del gen en el que se ha integrado la secuencia de IL-15 humana. Por ejemplo, tras la integración de la secuencia de IL-15 humana mediante recombinación homóloga, se puede eliminar parte o la totalidad de la secuencia codificante en el locus de integración, de modo que la secuencia de IL-15 humana se transcribe en su lugar. En algunos de dichos casos, la integración de una secuencia de IL-15 humana crea una mutación anuladora y, por lo tanto, un alelo nulo. Un alelo nulo es una copia mutante de un gen que carece por completo de la función normal de ese gen. Esto puede ser el resultado de la ausencia completa del producto génico (proteína, ARN) a nivel molecular, o la expresión de un producto génico no funcional. En el nivel fenotípico, un alelo nulo es indistinguible de una eliminación del locus completo.

En algunos casos, el ratón IL-15 humanizado, incluye una copia de la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína IL-15 humana. Por ejemplo, el ratón puede ser heterocigoto para la secuencia de ácido nucleico. En otras palabras, un alelo en un locus incluirá la secuencia de ácido nucleico, mientras que el otro será el alelo endógeno. Por ejemplo, como se ha comentado anteriormente, en algunos casos, una secuencia de ácido nucleico de IL-15 humana se integra en el locus de IL-15 del animal no humano, por ejemplo, de ratón, de tal manera que crea un alelo nulo para la IL-15 del animal no humano. En algunas dichas realizaciones, el animal no humano IL-15 humanizado puede ser heterocigoto para la secuencia de ácido nucleico que codifica la IL-15 humana, es decir, el ratón IL-15 humanizado incluye un alelo nulo para la IL-15 del animal no humano (el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico) y un alelo IL-15 endógeno (de tipo silvestre o de otro tipo). En otras palabras, el ratón es un animal no humano IL-15^{h/m}, donde "h" representa el alelo que incluye la secuencia humana y "m" representa el alelo endógeno. En otros casos, la IL-15 humanizada incluye dos copias de la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína IL-15 humana. Por ejemplo, el ratón puede ser homocigoto para la secuencia de ácido nucleico, es decir, ambos alelos para un locus en el genoma diploide incluirán la secuencia de ácido nucleico, es decir, el ratón IL-15 humanizado incluye dos alelos nulos para la IL-15 de ratón (el alelo que incluye la secuencia de ácido nucleico). En otras palabras, el ratón es un ratón IL-15^{h/h}.

RATONES SIRPα-IL-15 HUMANIZADOS

Al cruzar ratones IL-15 humanizados como se describe anteriormente con ratones SIRPα humanizados como se describe anteriormente, se pueden producir ratones genéticamente modificados que expresan tanto SIRPα humana como IL-15 humana. En la presente invención, dichos ratones genéticamente modificados son deficientes para un sistema inmunitario endógeno, por ejemplo, animales inmunodeprimidos, por ejemplo, como resultado de un alelo nulo para uno o ambos *Rag2* e *IL2ry*. Por ejemplo, un ratón de acuerdo con la presente divulgación es *Rag2*^{-/-} y/o *IL2ry*^{-/-} (o *Rag2*^{-/-} y/o *IL2ry*^{Y/-} donde el gen *IL2ry* se encuentra en el cromosoma X como en el ratón). En algunas realizaciones, se proporciona un ratón modificado genéticamente en donde el ratón modificado genéticamente es SIRPα^{h/m} IL-15^{h/m} *Rag2*^{-/-} *IL2ry*^{Y/-}, SIRPα^{h/h} IL-15^{h/m} *Rag2*^{-/-} *IL2ry*^{Y/-} o SIRPα^{h/m} IL-15^{h/h} *Rag2*^{-/-} *IL2ry*^{Y/-}.

En la presente invención, se proporciona un ratón modificado genéticamente que incluye una secuencia de ácido nucleico incorporada en el genoma del modificado genéticamente cuya secuencia codifica una proteína SIRPα humana y está unida operativamente a un promotor del gen *SIRPα*; y una secuencia de ácido nucleico incorporada en el genoma del modificado genéticamente, cuya secuencia codifica una proteína IL-15 humana y está unida operativamente a un promotor del gen *IL-15*, en donde el modificado genéticamente expresa la proteína SIRPα humana y la proteína IL-15 humana.

En la presente invención, el promotor del gen *SIRPα* es un promotor del gen *SIRPα* no humano endógeno en el locus del gen *SIRPα* del animal no humano.

En la presente invención, el promotor del gen *IL-15* es un promotor del gen *IL-15* en el locus del gen *IL-15* del animal no humano.

En algunas realizaciones, un modificado genéticamente como se describe en el presente documento expresa ARNm de IL-15 humana en el hígado, pulmón, médula ósea (MO), intestino delgado (ID) y colon.

En algunas realizaciones, un ratón modificado genéticamente, que expresa tanto SIRPα humana como IL-15 humana, como se describe en el presente documento, presenta un mayor porcentaje y número de linfocitos T humanos y células NK que un ratón modificado genéticamente que expresa solo SIRPα humana, después del injerto con células hematopoyéticas humanas, por ejemplo, células CD45⁺. En algunas realizaciones, un ratón genéticamente modificado que expresa tanto SIRPα humana como IL-15 humana, como se describe en el presente documento, presenta un mayor porcentaje y número de células NK en sangre y bazo. En algunas realizaciones, un ratón modificado genéticamente que expresa tanto SIRPα humana como IL-15 humana, como se describe en el presente documento, incluye ambos subconjuntos de células NK humanas, CD56^{brillante}CD16⁻ y CD56^{oscuro}CD16⁺, en la sangre, bazo e hígado, después del injerto con células hematopoyéticas humanas, por ejemplo, células CD45⁺. En algunas realizaciones, un ratón modificado genéticamente, que expresa tanto SIRPα humana como IL-15 humana, como se describe en el presente documento, presenta una distribución similar de células NK CD16⁺ frente a CD16⁻ en sangre.

como la distribución de células NK CD16+ frente a CD16- en PBMC obtenidas de sujetos humanos.

En algunas realizaciones, un ratón modificado genéticamente, que expresa tanto SIRPα humana como IL-15 humana, como se describe en el presente documento, incluye células NK en el hígado del ratón modificado genéticamente que presentan un nivel de expresión más elevado de CD16 y CD56, lo que indica una mayor maduración de las células NK, en relación con un ratón modificado genéticamente que solo expresa SIRPα humana, después del injerto con células hematopoyéticas humanas, por ejemplo, células CD45+.

En algunas realizaciones, un ratón modificado genéticamente, que expresa tanto SIRPα humana como IL-15 humana, como se describe en el presente documento, e injertado con células hematopoyéticas humanas, por ejemplo, células CD45+, incluye células NK en el bazo que presentan un nivel de expresión distinto de receptores inhibidores citolíticos, con la población de células NK CD56^{oscuro}CD16+ que incluye el mayor porcentaje de células que expresan CD158, similar a lo que se encuentra para los subconjuntos de células NK en la sangre de seres humanos.

En algunas realizaciones, un ratón modificado genéticamente, que expresa tanto SIRPα humana como IL-15 humana, como se describe en el presente documento, e injertado con células hematopoyéticas humanas, por ejemplo, células CD45+, presenta una mayor frecuencia de linfocitos T CD45+ y CD8+ humanos en la población de linfocitos intraepiteliales en relación con un ratón modificado genéticamente, que solo expresa SIRPα humana. En algunas realizaciones, un ratón modificado genéticamente, que expresa tanto SIRPα humana como IL-15 humana como se describe en el presente documento, e injertado con células hematopoyéticas humanas, presenta una distribución de células NK CD16+ frente a CD16- comparable en los LIE, y más células NK CD16+ que CD16- en la sangre y el bazo, lo que refleja la fisiología humana normal.

En algunas realizaciones, un ratón modificado genéticamente, que expresa tanto SIRPα humana como IL-15 humana, como se describe en el presente documento, e injertado con células hematopoyéticas humanas, por ejemplo, células CD45+, presenta un mayor número de linfocitos T humanos en el pulmón en relación con un ratón modificado genéticamente que solo expresa SIRPα humana. En algunas dichas realizaciones, dicho ratón genéticamente modificado presenta un nivel más elevado de expresión de CD69 en linfocitos T CD8+ humanos en el pulmón en relación con un ratón genéticamente modificado que expresa solo SIRPα humana.

En algunas realizaciones, un ratón modificado genéticamente, que expresa tanto SIRPα humana como IL-15 humana, como se describe en el presente documento, e injertado con células hematopoyéticas humanas, por ejemplo, células CD45+, presenta un nivel más elevado de expresión de CD69 en linfocitos T CD8+ humanos en el hígado en relación con un ratón modificado genéticamente que expresa solo SIRPα humana.

En algunas realizaciones, un ratón modificado genéticamente, que expresa tanto SIRPα humana como IL-15 humana, como se describe en el presente documento, e injertado con células hematopoyéticas humanas, presenta placas de Peyer discernibles que son predominantemente CD45+ humana.

En una realización, el sujeto genéticamente modificado es un ratón, por ejemplo, un ratón de una cepa C57BL (por ejemplo, C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, C57BL/Ola, etc.); un ratón de la cepa 129 (por ejemplo, 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2); un ratón de la cepa BALB; por ejemplo, BALB/c; y similares. Véase, por ejemplo, Festing *et al.* (1999) *Mammalian Genome* 10:836, véase también, Auerbach *et al.* (2000) "Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines". En otra realización, un ratón es una mezcla de las cepas antes mencionadas.

En la presente invención, el ratón genéticamente modificado sujeto es inmunodeficiente. "Inmunodeficiencia", incluye deficiencias en uno o más aspectos del sistema inmunitario nativo o endógeno de un animal, por ejemplo, el animal es deficiente para uno o más tipos de células inmunitarias del hospedador en funcionamiento, por ejemplo, deficiente para el número y/o función de linfocitos B no humanos, número y/o función de linfocitos T no humanos, número y/o función de células NK no humanas, etc.

Un método para lograr la inmunodeficiencia en los sujetos animales es la irradiación subletal. Por ejemplo, las crías de ratón genéticamente modificadas recién nacidas pueden irradiarse de forma subletal, por ejemplo, 2 × 200 cGy con un intervalo de cuatro horas. Como alternativa, la inmunodeficiencia se puede lograr mediante una cualquiera de una serie de mutaciones genéticas conocidas en la materia, cualquiera de las cuales puede cruzarse sola o en combinación con los animales no humanos genéticamente modificados objeto de la presente divulgación o que puede utilizarse como fuente de células madre en las que se pueden introducir las modificaciones genéticas de la presente divulgación. Los ejemplos no limitantes incluyen SCID ligada a X, asociada con mutaciones del gen *IL2ry* y caracterizada por el fenotipo de linfocitos T(-) B(+) NK(-); SCID autosómica recesiva asociada con mutaciones del gen *Jak3* y caracterizada por el fenotipo de linfocitos T(-) B(+) NK(-); mutaciones del gen *ADA* caracterizadas por el fenotipo de linfocitos T(-) B(-) NK(-); mutaciones de la cadena α de IL-7R caracterizadas por el fenotipo de linfocitos T(-) B(+) NK(+); mutaciones CD3 δ o ε caracterizadas por el fenotipo de linfocitos T(-) B(+) NK(+); mutaciones RAG1 y RAG2 caracterizadas por el fenotipo de linfocitos T(-) B(-) NK(+); mutaciones del gen *Artemis* caracterizadas por el fenotipo de linfocitos T(-) B(-)

) NK(+), mutaciones del gen *CD45* caracterizadas por el fenotipo de linfocitos T(-) B(+) NK(+); y mutaciones *Prkdcscid* caracterizadas por el fenotipo de linfocitos T(-), B(-). De esta manera, en algunas realizaciones, el animal no humano inmunodeficiente modificado genéticamente tiene una o más deficiencias seleccionadas de una deficiencia de la cadena γ del receptor IL2 (IL2 $\gamma^{y/-}$), una deficiencia de Jak3, una deficiencia de ADA, una deficiencia de IL7R, una deficiencia de CD3, una deficiencia de RAG1 y/o RAG2, una deficiencia de Artemis, una deficiencia de CD45 y una deficiencia de *Prkdc*. Estos y otros modelos animales de inmunodeficiencia serán conocidos por el experto en la materia, cualquiera de los cuales puede utilizarse para generar animales inmunodeficientes de la presente divulgación.

En algunas realizaciones, ratones genéticamente modificados de acuerdo con la invención encuentran uso como receptores de células hematopoyéticas humanas que son capaces de desarrollar células inmunitarias humanas a partir de células hematopoyéticas humanas injertadas. De esta manera, en algunos aspectos de la invención, el sujeto animal genéticamente modificado es un ratón genéticamente modificado inmunodeficiente al que se le han injertado células hematopoyéticas humanas.

INJERTO DE RATONES SIRP α -IL-15 HUMANIZADOS

Como se ha comentado anteriormente, en algunos aspectos de la invención, el ratón SIRP α -IL-15 humanizado, por ejemplo, a un ratón hSIRP α hIL-15 Rag2 $^{-/-}$ IL2 $\gamma^{y/-}$, o un ratón hSIRP α hIL-15 irradiado subletalmente, se le injerta, o trasplanta, células. Las células pueden ser células mitóticas o células posmitóticas, e incluyen células de interés tales como células madre pluripotentes, por ejemplo, células ME, células MPi y células germinales embrionarias; y células somáticas, por ejemplo, fibroblastos, células hematopoyéticas, neuronas, células musculares, células óseas, células endoteliales vasculares, células intestinales y similares, y sus progenitores y precursores restringidos por linaje. Las poblaciones de células de interés particular incluyen aquellas que comprenden células madre hematopoyéticas o progenitoras, que contribuirán o reconstituirán el sistema hematopoyético del animal no humano SIRP α -IL-15 humanizado, por ejemplo, leucocitos de sangre periférica, células hepáticas fetales, hueso fetal, timo fetal, ganglios linfáticos fetales, piel vascularizada, segmentos arteriales y células madre hematopoyéticas purificadas, por ejemplo, CMH movilizadas o CMH de sangre del cordón umbilical.

Cualquier fuente de células hematopoyéticas humanas, células madre hematopoyéticas (CMH) humanas y/o células madre hematopoyéticas progenitoras (CMHP) como se conocen en la materia o se describen en el presente documento pueden trasplantarse en los animales no humanos inmunodeficientes genéticamente modificados de la presente divulgación. Una fuente adecuada de células hematopoyéticas humanas conocida en la materia son las células sanguíneas del cordón umbilical humano, en particular las células positivas para CD34 (CD34 $^{+}$). Otra fuente de células hematopoyéticas humanas es el hígado fetal humano. Otra fuente es la médula ósea humana. También se incluyen las células madre pluripotentes inducidas (CMPi) y las células madre hematopoyéticas inducidas (CMHi) producidas por la desdiferenciación de células somáticas, por ejemplo, mediante métodos bien conocidos en la materia.

Las células pueden ser de cualquier especie de mamífero, por ejemplo, murina, roedor, caninas, felina, equina, bóvido, ovina, primate, humana, etc. Las células pueden ser de estirpes celulares establecidas o pueden ser células primarias, donde "células primarias", "estirpes celulares primarias" y "cultivos primarios" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a células y cultivos celulares que proceden de un sujeto y que se les ha permitido crecer *in vitro* durante un número limitado de pasajes, es decir, divisiones, del cultivo. Por ejemplo, los cultivos primarios son cultivos que pueden haber sido pasados 0 veces, 1 vez, 2 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces o 15 veces, pero no pasan por la etapa de crisis suficientes veces. Normalmente, las estirpes celulares primarias de la presente invención se mantienen durante menos de 10 pases *in vitro*.

Si las células son células primarias, pueden recogerse de un individuo por cualquier método conveniente. Por ejemplo, las células, por ejemplo, las células sanguíneas, por ejemplo, los leucocitos, pueden recogerse mediante aféresis, leucocitaféresis, separación por gradiente de densidad, etc. Como otro ejemplo, las células, por ejemplo, de la piel, músculo, médula ósea, bazo, hígado, páncreas, pulmón, intestino, tejido estomacal, etc. pueden recogerse mediante biopsia. Puede utilizarse una solución apropiada para la dispersión o suspensión de las células recogidas. Dicha solución generalmente será una solución de sal equilibrada, por ejemplo, salmuera normal, PBS, solución de sal equilibrada de Hank, etc., convenientemente complementada con suero fetal de ternero u otros factores de origen natural, junto con un tampón aceptable a baja concentración, generalmente de 5 a 25 mM. Los tampones convenientes incluyen HEPES, tampones fosfato, tampones lactato, etc.

En algunos casos, se trasplantará en el ratón humanizado una población heterogénea de células. En otros casos, una población de células que se enriquece para un tipo particular de célula, por ejemplo, una célula progenitora, por ejemplo, una célula progenitora hematopoyética, se injertará en el ratón humanizado. El enriquecimiento de una población de células de interés puede ser mediante cualquier técnica de separación conveniente. Por ejemplo, las células de interés pueden enriquecerse mediante métodos de cultivo. En dichos métodos de cultivo, normalmente, se añaden factores de crecimiento y nutrientes particulares a un cultivo que promueven la supervivencia y/o la proliferación de una población de células sobre otras. Otras condiciones de cultivo que afectan la supervivencia y/o la proliferación incluyen crecimiento en sustratos adherentes o no adherentes, cultivo durante periodos de tiempo particulares, etc. Dichas condiciones de cultivo son bien conocidas en la materia. Como otro ejemplo, las células de

interés pueden enriquecerse mediante la separación de las células de interés de la población inicial mediante técnicas de separación por afinidad. Las técnicas para la separación por afinidad pueden incluir separación magnética que utiliza perlas magnéticas recubiertas con un reactivo de afinidad, cromatografía de afinidad, "cribado" con un reactivo de afinidad unido a una matriz sólida, por ejemplo, una placa, agentes citotóxicos unidos a un reactivo de afinidad o utilizado junto con un reactivo de afinidad, por ejemplo, complemento o citotoxinas, u otra técnica conveniente. Las técnicas que proporcionan una separación precisa incluyen clasificador celular activado por fluorescencia, que puede tener diversos grados de sofisticación, como canales de color múltiples, canales de detección de dispersión de luz de ángulo bajo y obtuso, canales de independencia, etc. Las células pueden seleccionarse contra células muertas mediante el empleo de colorantes asociados con células muertas (por ejemplo, yoduro de propidio). Puede emplearse cualquier técnica que no sea indebidamente perjudicial para la viabilidad de las células de interés.

Por ejemplo, utilizando técnicas de separación por afinidad, las células que no son las células de interés para el trasplante pueden agotarse de la población al poner en contacto la población con reactivos de afinidad que reconocen específicamente y unen selectivamente marcadores que no se expresan en las células de interés. Por ejemplo, para enriquecer a una población de células progenitoras hematopoyéticas, se podrían agotar las células que expresan marcadores de células hematopoyéticas maduras. De manera adicional o como alternativa, la selección positiva y la separación se pueden realizar mediante el contacto de la población con reactivos de afinidad que reconocen específicamente y unen selectivamente marcadores asociados con células progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, CD34, CD133, etc. Por "unión selectiva" se entiende que la molécula se une preferentemente a la diana de interés o se une con mayor afinidad a la diana que a otras moléculas. Por ejemplo, un anticuerpo se unirá a una molécula que incluye un epítipo para el que es específico y no a epítopos no relacionados. En algunas realizaciones, el reactivo de afinidad puede ser un anticuerpo, es decir, un anticuerpo que es específico para CD34, CD133, etc. En algunas realizaciones, el reactivo de afinidad puede ser un receptor o ligando específico para CD34, CD133, etc., por ejemplo, un ligando peptídico y receptor; moléculas efectoras y receptoras, un receptor de linfocitos T específico para CD34, CD133, etc., y similares. En algunas realizaciones, pueden utilizarse reactivos de afinidad múltiple específicos para el marcador de interés.

Los anticuerpos y los receptores de linfocitos T que se utilizan como reactivos de afinidad pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden ser producidos por animales transgénicos, animales inmunizados, linfocitos B humanos o de animal inmortalizados, células transfectadas con vectores de ADN que codifica el anticuerpo o el receptor de linfocitos T, etc. Los detalles de la preparación de anticuerpos y su idoneidad para su uso como miembros de unión específica son bien conocidos por los expertos en la materia. De particular interés es la utilización de anticuerpos marcados como reactivos de afinidad. De manera conveniente, estos anticuerpos están conjugados con un marcador para su uso en la separación. Los marcadores incluyen perlas magnéticas, que permiten la separación directa; biotina, que se puede eliminar con avidina o estreptavidina unida a un soporte; fluorocromos, que pueden utilizarse con un clasificador celular activado por fluorescencia; o similares, para permitir la facilidad de separación del tipo de célula particular. Los fluorocromos que encuentran utilidad incluyen ficobiliproteínas, por ejemplo, ficoeritrina y alofococianinas, fluoresceína y rojo Texas. Con frecuencia, cada anticuerpo se marca con un fluorocromo diferente, para permitir la clasificación independiente para cada marcador.

La población inicial de células se pone en contacto con el (los) reactivo(s) de afinidad y se incuba durante un período de tiempo suficiente para unir los antígenos de superficie celular disponibles. La incubación generalmente será de al menos aproximadamente 5 minutos y generalmente de menos de aproximadamente 60 minutos. Es deseable tener una concentración suficiente de anticuerpos en la mezcla de reacción, de modo que la eficacia de la separación no está limitada por la falta de anticuerpos. La concentración adecuada se determina mediante valoración, pero normalmente será una dilución de anticuerpo en el volumen de la suspensión celular que es aproximadamente 1:50 (es decir, 1 parte de anticuerpo frente a 50 partes de volumen de reacción), aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:150, aproximadamente 1:200, aproximadamente 1:250, aproximadamente 1:500, aproximadamente 1:1000, aproximadamente 1:2000 o aproximadamente 1:5000. El medio en el que se suspenderán las células será cualquier medio que mantenga la viabilidad de las células. Un medio preferido es solución salina tamponada con fosfato que contiene del 0,1 al 0,5 % de BSA o del 1 al 4 % de suero de cabra. Diversos medios están disponibles en el mercado y pueden usarse de acuerdo con la naturaleza de las células, incluido el medio Eagle modificado de Dulbecco (dMEM), la solución salina equilibrada de Hank (HBSS), la solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (dPBS), RPMI, medio de Iscove, PBS con EDTA 5 mM, etc., con frecuencia complementados con suero fetal de ternero, BSA, HSA, suero de cabra, etc.

Las células en la población puesta en contacto que se marcan con el reactivo de afinidad se seleccionan mediante cualquier técnica de separación por afinidad conveniente, por ejemplo, como se describe anteriormente o como se conoce en la materia. Después de la separación, las células separadas pueden recogerse en cualquier medio adecuado que mantenga la viabilidad de las células, que generalmente tiene una banda de suero en el fondo del tubo de recogida. Diversos medios están disponibles en el mercado y pueden usarse de acuerdo con la naturaleza de las células, incluidos dMEM, HBSS, dPBS, RPMI, medio de Iscove, etc., con frecuencia complementados con suero fetal de ternero.

Las composiciones altamente enriquecidas para un tipo celular de interés, por ejemplo, células hematopoyéticas, se logran de esta manera. Las células serán aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente

un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 % o más de la composición celular, aproximadamente un 95 % o más de la composición celular enriquecida y, preferentemente, serán aproximadamente un 95 % o más de la composición celular enriquecida. En otras palabras, la composición será una composición sustancialmente pura de las células de interés.

5 Las células que se van a trasplantar en los ratones SIRPα-IL-15 humanizados, sea una población heterogénea de células o una población enriquecida de células, pueden trasplantarse inmediatamente. Como alternativa, las células pueden congelarse a temperaturas de nitrógeno líquido y almacenarse durante largos períodos de tiempo, descongelándose y siendo capaces de reutilizarse. En dichos casos, las células generalmente se congelarán en
10 DMSO al 10 %, suero al 50 %, medio tamponado al 40 % o alguna otra solución similar como se utiliza normalmente en la materia para conservar las células a dichas temperaturas de congelación, y se descongelarán de la manera normalmente conocida en la materia para descongelar células cultivadas congeladas. De manera adicional o como alternativa, las células pueden cultivarse *in vitro* en diversas condiciones de cultivo. El medio de cultivo puede ser líquido o semisólido, por ejemplo, que contiene agar, metilcelulosa, etc. La población celular puede suspenderse
15 convenientemente en un medio nutriente apropiado, tal como DMEM modificado de Iscove o RPMI-1640, normalmente complementado con suero fetal de ternero (aproximadamente de un 5 a un 10 %), L-glutamina, un tiol, particularmente 2-mercaptoetanol, y antibióticos, *por ejemplo*, penicilina y estreptomicina. El cultivo puede contener factores de crecimiento a los que las células son sensibles. Los factores de crecimiento, como se define en el presente documento, son moléculas capaces de fomentar la supervivencia, el crecimiento y/o la diferenciación de las células, ya sea en
20 cultivo o en el tejido inalterado, a través de efectos específicos sobre un receptor transmembrana. Los factores de crecimiento incluyen factores polipeptídicos y no polipeptídicos.

Las células pueden modificarse genéticamente antes de trasplantarlas a los ratones SIRPα-IL-15, por ejemplo, para proporcionar un marcador seleccionable o detectable, para inducir un defecto genético en las células (por ejemplo, para el modelado de enfermedades), para reparar un defecto genético o expresar ectópicamente un gen en las células (por ejemplo, para determinar si dichas modificaciones afectarán el curso de la enfermedad), etc. Las células pueden modificarse genéticamente mediante transfección o transducción con un vector adecuado, recombinación de homólogos u otra técnica adecuada, para que expresen un gen de interés, o con un ARNm antisentido, ARNip o ribozimas para bloquear la expresión de un gen no deseado. Se conocen diversas técnicas en la materia para la
25 introducción de ácidos nucleicos en células diana. Para demostrar que se ha modificado genéticamente las células, se pueden emplear diversas técnicas. El genoma de las células puede restringirse y utilizarse con o sin amplificación. Se puede emplear la reacción en cadena de la polimerasa, la electroforesis en gel; el análisis de restricción; las transferencias Southern, Northern y Western; la secuenciación; o similares. Los métodos generales en bioquímica molecular y celular para estos y otros propósitos divulgados en esta solicitud se pueden encontrar en libros de texto
30 convencionales como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.^a ed. (Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001); *Short Protocols in Molecular Biology*, 4.^a ed. (Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons 1999); "Protein Methods" (Bollag *et al.*, John Wiley & Sons 1996); "Nonviral Vectors for Gene Therapy" (Wagner *et al.* eds., Academic Press 1999); "Viral Vectors" (Kapliff & Loewy eds., Academic Press 1995); "Immunology Methods Manual" (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); y "Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology" (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998). Los reactivos, vectores de clonación y kits para la manipulación genética a los que se hace
35 referencia en esta divulgación están disponibles en proveedores comerciales como BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich y ClonTech.

Las células se pueden trasplantar en los animales no humanos humanizados SIRPα-IL-15, por ejemplo, ratones, mediante cualquier método conveniente, incluidos, por ejemplo, inyección intrahepática, inyección en la vena caudal, inyección retroorbital y similares. Normalmente, se trasplantan aproximadamente de $0,5 \times 10^5$ a 2×10^6 células pluripotentes o progenitoras, por ejemplo, aproximadamente de 1×10^5 a 1×10^6 células, o aproximadamente de 2×10^5 a 5×10^5 células. En algunos casos, el animal no humano, por ejemplo, ratón, se irradia subletalmente antes de trasplantar las células humanas. En otras palabras, el animal no humano, por ejemplo, ratón, está expuesto a una
45 dosis subletal de radiación, por ejemplo, como se conoce en la materia. El ratón SIRPα-IL-15 humanizado injertado se mantiene en condiciones de laboratorio de cría de animales durante al menos 1 semana, por ejemplo, 1 semana o más, o dos semanas o más, a veces 4 semanas o más, y en algunos casos 6 semanas o más, tal como 10 semanas o más, o 15 semanas o más, para permitir una reconstitución suficiente del sistema inmunitario con las células injertadas.

55 Los ratones SIRPα-IL-15 humanizados y los ratones SIRPα-IL-15 humanizados injertados con células hematopoyéticas humanas, por ejemplo, los ratones hSIRPα hIL-15 injertados Rag2^{-/-}IL2ry^{Y/-}, y, opcionalmente, otras modificaciones genéticas son útiles en muchas aplicaciones. Por ejemplo, estos ratones proporcionan un sistema útil para modelar enfermedades inmunitarias humanas y patógenos humanos. Por ejemplo, los ratones sujetos son útiles
60 para modelar, por ejemplo, el desarrollo y la función de células citolíticas naturales (NK) y/o linfocitos T humanos; la infección por patógenos humanos de tejidos y/o células específicos, por ejemplo, infección por patógenos humanos del intestino o los pulmones, y/o infección por patógenos humanos o respuesta a células NK y/o linfocitos T humanos. Dichos ratones también encuentran uso en la detección *in vivo* de agentes que inhiben la infección por un patógeno, por ejemplo, un patógeno que afecta (por ejemplo, que infecta) un tejido específico o un tipo de célula, por ejemplo, un patógeno humano del intestino o los pulmones, por ejemplo, un patógeno humano que activa, induce y/o se dirige a linfocitos T y/o células NK; en la selección *in vivo* de agentes que modulan el desarrollo y/o la función de células NK
65

y/o linfocitos T humanos, por ejemplo, en un estado sano o enfermo; en la selección *in vivo* de agentes que son tóxicos para las células NK y/o linfocitos T humanos; en la selección *in vivo* de agentes que evitan, mitigan o revierten los efectos tóxicos de los agentes tóxicos en las células NK y/o linfocitos T humanos; en la selección *in vivo* de vacunas candidatas inductoras de linfocitos T; y en la selección *in vivo* e *in vitro* de agentes que inhiben el crecimiento tumoral y/o la infección mediante la activación de procesos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediados por células NK.

La presente divulgación proporciona resultados inesperados que demuestran que los ratones SIRPα-IL-15 humanizados, injertados con células hematopoyéticas humanas, por ejemplo, ratones hSIRPα hIL-15 injertados Rag2^{-/-} IL2ry^{+/+}, desarrollan linfocitos residentes en tejidos, por ejemplo, linfocitos intraepiteliales, en el intestino y el pulmón. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona modelos animales no disponibles anteriormente que permiten el control y el ensayo de dichos linfocitos residentes en tejidos. Dichos modelos animales son particularmente útiles para modelar la respuesta inmunitaria de los linfocitos residentes en tejidos, por ejemplo, linfocitos T y células NK, a patógenos humanos que afectan (por ejemplo, que infectan) el intestino y/o el pulmón y para la selección de terapias y vacunas que se dirigen a dichos patógenos y/o inducen o mejoran una respuesta de linfocitos residentes en tejidos. Además, la presencia de estos linfocitos residentes en tejidos también permite el modelado de enfermedades autoinmunitarias impulsadas por células inmunitarias humanas que afectan al tubo gastrointestinal, tal como la enfermedad celíaca y la EII.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un modelo *in vivo*, que incluye un ratón modificado genéticamente que incluye una secuencia de ácido nucleico incorporada en el genoma del animal no humano modificado genéticamente, cuya secuencia codifica una proteína SIRPα humana y está ligada operativamente a un promotor del gen *SIRPα*. El ratón modificado genéticamente también incluye una secuencia de ácido nucleico incorporada en el genoma del ratón modificado genéticamente, cuya secuencia codifica una proteína IL-15 humana y está unida operativamente a un promotor del gen *IL-15*. Por último, el ratón modificado genéticamente incluye un injerto de células hematopoyéticas humanas, en donde el animal no humano modificado genéticamente (i) expresa la proteína SIRPα humana y la proteína IL-15 humana, y (ii) incluye linfocitos residentes en tejidos humanos, por ejemplo, linfocitos intraepiteliales (LIE), en el intestino del animal no humano modificado genéticamente. En algunas dichas realizaciones, el ratón genéticamente modificado está infectado con un patógeno humano, por ejemplo, un patógeno humano que afecta (por ejemplo, que infecta) el intestino.

Los patógenos humanos que pueden afectar (por ejemplo, infectar) el intestino incluyen, pero sin limitación, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, rotavirus humano, *Listeria monocytogenes*, virus de Norwalk, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* y *Helicobacter pylori*.

En otras realizaciones, la presente divulgación proporciona un modelo *in vivo*, que incluye un ratón modificado genéticamente que incluye una secuencia de ácido nucleico incorporada en el genoma del ratón modificado genéticamente cuya secuencia codifica una proteína SIRPα humana y está unida operativamente a un promotor del gen *SIRPα*. El ratón modificado genéticamente también incluye una secuencia de ácido nucleico incorporada en el genoma del animal no humano modificado genéticamente, cuya secuencia codifica una proteína IL-15 humana y está unida operativamente a un promotor del gen *IL-15*. Por último, el ratón modificado genéticamente incluye un injerto de células hematopoyéticas humanas, en donde el ratón modificado genéticamente (i) expresa la proteína SIRPα humana y la proteína IL-15 humana, y (ii) incluye linfocitos residentes en tejidos humanos, por ejemplo, linfocitos intraepiteliales (LIE), en el pulmón del animal no humano modificado genéticamente. En algunas dichas realizaciones, el animal no humano modificado genéticamente está infectado por un patógeno humano, por ejemplo, un patógeno humano que afecta (por ejemplo, infecta) el pulmón.

Los patógenos humanos que pueden afectar (por ejemplo, infectar) el pulmón incluyen, pero sin limitación, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenza*, *Corynebacterium diphtheria*, el coronavirus del SARS, *Bordetella pertussis*, *Moraxella catarrhalis*, virus de la gripe (A, B y C), coronavirus, adenovirus, virus respiratorio sincicial, virus de parainfluenza, virus de las paperas, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, neumonía por micoplasma, tuberculosis por *Mycobacterium*, *Chlamydia Pneumoniae*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*.

Se necesitan nuevas terapias, nuevas vacunas y nuevas formas de probar la eficacia de terapias y vacunas. Un animal no humano, por ejemplo, ratón, que admita un injerto eficaz de linfocitos T y células NK humanas, por ejemplo, sería útil para identificar nuevas terapias y nuevas vacunas, en particular para un patógeno humano que infecta linfocitos T y/o células NK humanas. Se podrían probar nuevas terapias y nuevas vacunas en dicho animal no humano, por ejemplo, ratón, mediante, por ejemplo, la determinación de la cantidad de un patógeno humano, por ejemplo, un virus, en el animal no humano (en la sangre o en un tejido determinado) en respuesta al tratamiento con un supuesto agente antivírico, o mediante la inoculación al ratón de una supuesta vacuna seguida de la exposición a una administración infecciosa de un patógeno humano, por ejemplo, el VIH, y la observación de cualquier cambio en la infecciosidad debido a la inoculación por la supuesta vacuna en comparación con un control no inoculado con la vacuna pero infectado con el VIH.

Dichos modelos de infección por patógenos en animales no humanos, por ejemplo, un ratón, son útiles en investigación, por ejemplo, para comprender mejor la progresión de una infección humana. Dichos modelos de infección en ratones también son útiles en el descubrimiento de fármacos, por ejemplo, para identificar agentes candidatos que protegen o tratan una infección.

Los animales genéticamente modificados injertados de la presente divulgación encuentran uso en la selección de agentes candidatos para identificar aquellos que tratarán infecciones por patógenos humanos, por ejemplo, patógenos humanos que se dirigen a los linfocitos T y/o células NK humanas. Los términos "tratar", "tratamiento", "que trata" y similares se utilizan en el presente documento para incluir en líneas generales la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en lo referente a prevenir completa o parcialmente una enfermedad o un síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en lo referente a una cura parcial o completa para una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se utiliza en el presente documento, incluye cualquier tratamiento de una enfermedad de un mamífero e incluye: (a) prevenir que se produzca la enfermedad en un sujeto que pueda tener predisposición a la enfermedad, pero al que aún no se le haya diagnosticado; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad.

Los términos "individuo", "sujeto", "hospedador", y "paciente" se utilizan indistintamente en el presente documento e incluyen cualquier sujeto mamífero para el que se desea el diagnóstico, tratamiento o terapia, en particular, seres humanos.

Los animales no humanos SIRP α -IL-15 humanizados, por ejemplo, ratones, injertados con células hematopoyéticas humanas proporcionan un sistema útil para seleccionar agentes candidatos para otras actividades deseadas *in vivo*, así como, por ejemplo, para agentes que pueden modular (es decir, promover o suprimir) el desarrollo y/o la actividad de los linfocitos T y células NK humanas, por ejemplo, en un estado sano o enfermo, por ejemplo, para identificar nuevas terapias y/o desarrollar una mejor comprensión de las bases moleculares del desarrollo y la función del sistema inmunitario; para agentes que son tóxicos para los linfocitos T y/o las células NK y sus progenitores; y para agentes que evitan, mitigan o revierten los efectos tóxicos de agentes tóxicos en linfocitos T, células NK y sus progenitores; para anticuerpos o proteínas de unión a antígeno que median los procesos de ADCC dependientes de células NK, etc. Como otro ejemplo más, los ratones modificados genéticamente descritos en el presente documento proporcionan un sistema útil para predecir la capacidad de respuesta de un individuo a una terapia de enfermedad, por ejemplo, proporcionando una plataforma *in vivo* para seleccionar la capacidad de respuesta del sistema inmunitario de un individuo a un agente, por ejemplo, un agente terapéutico, para predecir la capacidad de respuesta de un individuo a ese agente.

En ensayos de selección para agentes biológicamente activos, los animales no humanos SIRP α -IL-15 humanizados, por ejemplo, ratones, por ejemplo, ratones hSIRP α hIL-15 injertados Rag2^{-/-}IL2ry^{Y/-}, que se han injertado con células hematopoyéticas humanas y, en algunos casos, infectados con patógenos humanos, o células para ser injertadas en un animal no humano SIRP α -IL-15 humanizado, por ejemplo, ratón, se ponen en contacto con un agente candidato de interés y se evalúa el efecto del agente candidato mediante el control de uno o más parámetros de producción. Estos parámetros de producción pueden reflejar la viabilidad de las células, por ejemplo, el número total de células hematopoyéticas o el número de células de un tipo de células hematopoyéticas particular, o del estado apoptótico de las células, por ejemplo, la cantidad de fragmentación del ADN, la cantidad de zeiosis celular, la cantidad de fosfatidilserina en la superficie de la célula y similares mediante métodos que son bien conocidos en la materia. Como alternativa o además, estos parámetros de producción pueden reflejar la capacidad de diferenciación de las células, por ejemplo, las proporciones de células diferenciadas y tipos de células diferenciadas, por ejemplo, linfocitos T y/o células NK. Como alternativa o además, estos parámetros de producción pueden reflejar la función de las células, por ejemplo, las citocinas y quimiocinas producidas por las células, la capacidad de las células para dirigirse y extravasarse a un sitio de exposición, la capacidad de las células para modular, es decir, promover o suprimir, la actividad de otras células *in vitro* o *in vivo*, etc. Otros parámetros de producción pueden reflejar la extensión de la infección de patógenos en el animal, por ejemplo, el valor del patógeno en el animal no humano, por ejemplo, ratón, etc.

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

Los agentes candidatos de interés para el cribado incluyen compuestos conocidos y desconocidos que abarcan numerosas clases químicas, principalmente moléculas orgánicas, que pueden incluir moléculas organometálicas,

moléculas inorgánicas, secuencias genéticas, vacunas, antibióticos u otros agentes sospechosos de tener propiedades antibióticas, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, proteínas de unión a antígeno, agentes que han sido aprobados como productos farmacéuticos para su uso en seres humanos, etc. Un aspecto importante de la invención es evaluar fármacos candidatos, incluyendo controles de toxicidad; y similares.

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

Los agentes candidatos de interés para el cribado también incluyen ácidos nucleicos, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican ARNip, ARNhc, moléculas antisentido o ARNm o ácidos nucleicos que codifican polipéptidos. Se encuentran disponibles muchos vectores útiles para transferir ácidos nucleicos a células diana. Los vectores pueden mantenerse episomalmente, por ejemplo, como plásmidos, ADN de minicírculos, vectores procedentes de virus tales como citomegalovirus, adenovirus, etc., o pueden estar integrados en el genoma de la célula diana, a través de recombinación homóloga o integración aleatoria, por ejemplo, vectores procedentes de retrovirus tales como MMLV, VIH-1, VLA, etc. Los vectores se pueden proporcionar directamente a las células sujeto. En otras palabras, las células pluripotentes se ponen en contacto con vectores que incluyen el ácido nucleico de interés de manera que los vectores son captados por las células.

Los métodos para poner en contacto las células, por ejemplo, células en cultivo o células en un animal no humano, por ejemplo, ratón, con vectores de ácidos nucleicos, tales como electroporación, transfección con cloruro de calcio y lipofección, son bien conocidos en la materia. Como alternativa, el ácido nucleico de interés puede proporcionarse a las células a través de un virus. En otras palabras, las células se ponen en contacto con partículas víricas que incluyen el ácido nucleico de interés. Los retrovirus, por ejemplo, los lentivirus, son particularmente adecuados para el método de la invención. Los vectores retrovíricos comúnmente usados son "defectuosos", es decir, incapaces de producir proteínas víricas necesita para una infección productiva. En su lugar, la replicación del vector necesita crecimiento en una estirpe celular de empaquetamiento. Para generar partículas víricas que incluyen ácidos nucleicos de interés, los ácidos nucleicos retrovíricos que incluyen el ácido nucleico se empaquetan en cápsidas víricas mediante una estirpe celular de empaquetamiento. Las diferentes estirpes celulares de empaquetamiento proporcionan una proteína de envoltura diferente para ser incorporada en la cápside, esta proteína de envoltura determina la especificidad de la partícula vírica para las células. Las proteínas de envoltura son de al menos tres tipos, ecotrópicas, anfotrópicas y xenotrópicas. Los retrovirus empaquetados con proteína de envoltura ecotrópica, por ejemplo, MMLV, son capaces de infectar la mayoría de los tipos de células murinas y de rata, y se generan mediante la utilización de estirpes celulares de empaquetamiento ecotrópico, tales como BOSC23 (Pear *et al.* (1993) P.N.A.S. 90:8392-8396). Los retrovirus que portan proteína de envoltura anfotrópica, por ejemplo, 4070A (Danos *et al.*, anteriormente citado), son capaces de infectar a la mayoría de los tipos celulares de mamíferos, incluido del ser humano, perros y ratones, y se generan mediante la utilización de estirpes celulares de empaquetamiento anfotrópico, tales como PA12 (Miller *et al.* (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317 (Miller *et al.* (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902); GRIP (Danos *et al.* (1988) PNAS 85:6460-6464). Los retrovirus empaquetados con proteína de envoltura xenotrópica, por ejemplo, AKR env, son capaces de infectar a la mayoría de los tipos celulares de mamíferos, excepto a las células murinas. La estirpe celular de empaquetamiento adecuada puede utilizarse para asegurar que las células de interés, en algún caso, las células injertadas, en algún ejemplo, la célula del hospedador, es decir, los SIRPα-IL-15 humanizados, son el objetivo de las partículas víricas empaquetadas.

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

Los agentes candidatos de interés para el cribado también incluyen polipéptidos. Dichos polipéptidos pueden

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

El agente polipeptídico candidato puede producirse a partir de células eucariotas, o puede producirse mediante células procariotas. Puede procesarse adicionalmente mediante despliegue, por ejemplo, desnaturalización por calor, reducción de DTT, etc. y pueden volverse a plegar, mediante métodos conocidos en la materia. Las modificaciones de interés que no alteran la secuencia primaria incluyen derivatización química de polipéptidos, por ejemplo, acilación, acetilación, carboxilación, amidación, etc. También se incluyen modificaciones de glucosilación, por ejemplo, las realizadas mediante la modificación de los patrones de glucosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales; por ejemplo, mediante la exposición del polipéptido a enzimas que afectan la glucosilación, tales como enzimas glucosilantes o desglucosilantes de mamífero. También se incluyen secuencias que tienen restos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina. Los polipéptidos pueden haberse modificado utilizando técnicas biológicas moleculares ordinarias y química sintética para mejorar su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad o para hacerlas más adecuadas como agente terapéutico. Los análogos de tales polipéptidos incluyen aquellos que contienen restos distintos de los L-aminoácidos de origen natural, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos que no son de origen natural. Los D-aminoácidos pueden ser sustituidos por algunos o todos los restos de aminoácidos.

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

En algunos casos, los agentes polipeptídicos candidatos a cribar son anticuerpos o proteínas de unión a antígeno. El término "anticuerpo" o "fracción de anticuerpo" pretende incluir cualquier estructura molecular que contenga cadenas polipeptídicas con una forma específica que se ajuste a un epítipo y lo reconozca, donde una o más interacciones de unión no covalentes estabilizan el complejo entre la estructura molecular y el epítipo. El ajuste específico o selectivo de una estructura dada y su epítipo específico a veces se denomina ajuste de "bloqueo y llave". La molécula de anticuerpo arquetípica es la inmunoglobulina, y todos los tipos de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, etc., de todas las fuentes, por ejemplo, ser humano, roedor, conejo, vaca, oveja, cerdo, perro, otros mamíferos, pollo, otras aves, etc., se consideran "anticuerpos". Los anticuerpos utilizados en la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos se proporcionan normalmente en los medios en los que se cultivan las células. Además de los anticuerpos, las proteínas de unión a antígeno abarcan polipéptidos que también están diseñados para unirse a un antígeno de interés y provocar una respuesta, por ejemplo, una reacción inmunitaria. Los fragmentos de unión a antígeno conocidos en la materia (que incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc y scFv) también están incluidos en la expresión "proteína de unión a antígeno". Los términos "anticuerpo" y "proteína de unión a antígeno" también incluyen una o más cadenas o fragmentos de inmunoglobulina que pueden conjugarse químicamente, o expresarse como, proteínas de fusión con otras proteínas, anticuerpos monocatenarios y anticuerpos biespecíficos.

Los agentes candidatos pueden obtenerse a partir de una amplia variedad de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, se encuentran disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una gran variedad de compuestos orgánicos, incluidas las biomoléculas, que incluyen la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Como alternativa, se encuentran disponibles o se producen fácilmente bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Además, las bibliotecas y compuestos naturales o producidos de manera sintética se modifican fácilmente por medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y pueden utilizarse para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc. para producir análogos estructurales.

Los agentes candidatos se criban para la actividad biológica mediante la administración del agente a al menos una y, normalmente, una pluralidad de muestras, a veces junto con muestras que carecen del agente. Se mide el cambio en los parámetros en respuesta al agente y se evalúa el resultado en comparación con los cultivos de referencia, por ejemplo, en presencia y ausencia del agente, obtenido con otros agentes, etc. En los casos en los que se realiza un cribado para identificar los agentes candidatos que evitarán, mitigarán o revertirán los efectos de un agente tóxico, el cribado generalmente se realiza en presencia del agente tóxico, donde el agente tóxico se añade en el momento más apropiado para los resultados a determinar. Por ejemplo, en los casos en los que se prueba la capacidad protectora/preventiva del agente candidato, el agente candidato se puede añadir antes del agente tóxico, simultáneamente con el agente candidato, o después del tratamiento con el agente candidato. Como otro ejemplo, en los casos en que se prueba la capacidad del agente candidato para revertir los efectos de un agente tóxico, el agente candidato se puede añadir después del tratamiento con el agente candidato. Tal como se ha mencionado anteriormente, en algunos casos, la muestra es el animal no humano SIRP α -IL-15 humanizado, por ejemplo, ratón, al que se han injertado células, es decir, se proporciona un agente candidato al animal no humano SIRP α -IL-15 humanizado, por ejemplo, ratón, al que se han injertado células. En algunos casos, la muestra son las células a injertar, es decir, el agente candidato se proporciona a las células antes del trasplante.

Si el agente candidato se va a administrar directamente al animal no humano, por ejemplo, ratón, el agente se puede administrar mediante cualquiera de una serie de métodos bien conocidos en la materia para la administración de péptidos, moléculas pequeñas y ácidos nucleicos. Por ejemplo, el agente puede administrarse por vía oral, mucosa, tópica, intradérmica o por inyección, por ejemplo, inyección intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intravenosa o intracraneal, y similares. El agente puede administrarse en un tampón, o puede incorporarse en cualquiera de una variedad de formulaciones, por ejemplo, mediante combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. "Vehículos farmacéuticamente aceptables" pueden ser vehículos aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerados en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en mamíferos, tales como en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o transportador con el que un compuesto de la invención se formula para la administración a un mamífero. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser lípidos, por ejemplo, liposomas, por ejemplo, dendrímeros liposómicos; líquidos, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, solución salina; goma arábiga, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además, se pueden utilizar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse en preparados en forma sólida, semisólida, líquida o gaseosa, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. El agente puede ser sistémico después de la administración o puede localizarse mediante la utilización de administración regional, administración intramural o la utilización de un implante que actúa para retener la dosis activa en el sitio de la implantación. El agente activo puede formularse para actividad inmediata o puede formularse para liberación sostenida. Para algunas afecciones, en particular las afecciones del sistema nervioso central, puede ser necesario formular agentes para cruzar la barrera hematoencefálica (BHE). Una estrategia para la administración de fármacos a través de la barrera hematoencefálica (BHE) implica la interrupción de la BHE, ya sea por medios osmóticos como el manitol o los leucotrienos, o bioquímicamente mediante la utilización de sustancias vasoactivas como la bradicinina. Un agente disruptivo de la BHE puede coadministrarse con el agente cuando las composiciones se administran mediante inyección intravascular. Otras estrategias para pasar por la BHE pueden implicar la utilización de sistemas de transporte endógenos, que incluyen transcitosis mediada por Caveolin-1, transportadores mediados por portadores, tales como portadores de glucosa y aminoácidos, transcitosis mediada por receptor para insulina o transferrina, y transportadores de eflujo activo, tales como p-glucoproteína. Las fracciones de transporte activo también se pueden conjugar con los compuestos terapéuticos para su uso en la invención para facilitar el transporte a través de la pared endotelial del vaso sanguíneo. Como alternativa, la liberación de fármacos por detrás de la BHE puede realizarse mediante liberación local, por ejemplo, mediante liberación intratecal, por ejemplo, a través de un depósito de Ommaya (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos números 5.222.982 y 5385582); mediante inyección en bolo, por ejemplo, mediante una jeringa, por ejemplo, intravital o intracranealmente; mediante infusión continua, por ejemplo, mediante canulación, por ejemplo, con convección (véase, por ejemplo, la solicitud de los Estados Unidos n.º 20070254842); o mediante implantación de un dispositivo sobre el cual el agente se ha fijado de manera reversible (véanse, por ejemplo, las solicitudes de los Estados Unidos n.º 20080081064 y 20090196903).

Si el agente(s) candidato se proporciona a las células antes del trasplante, los agentes se añaden convenientemente

en la solución o en forma fácilmente soluble, al medio de las células en cultivo. Los agentes se pueden añadir en un sistema de flujo continuo, como una corriente, intermitente o continuo, o como alternativa, mediante la adición de un bolo del compuesto, de manera individual o incremental, a una solución de otra manera estática. En un sistema de flujo continuo, se utilizan dos líquidos, donde uno es una solución fisiológicamente neutra y el otro es la misma solución con el compuesto de ensayo añadido. Se hace pasar el primer líquido sobre las células, seguido del segundo. En un único método de solución, se añade un bolo del compuesto de ensayo al volumen del medio que rodea las células. Las concentraciones globales de los componentes del medio de cultivo no deberían cambiar significativamente con la adición del bolo, o entre las dos soluciones en un método de flujo continuo.

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

Un análisis de la respuesta de las células en un animal no humano SIRPα-IL-15 humanizado, por ejemplo, ratón, al agente candidato puede realizarse en cualquier momento después del tratamiento con el agente. Por ejemplo, las células pueden analizarse 1, 2 o 3 días, a veces 4, 5 o 6 días, a veces 8, 9 o 10 días, a veces 14 días, a veces 21 días, a veces 28 días, a veces 1 mes o más después del contacto con el agente candidato, por ejemplo, 2 meses, 4 meses, 6 meses o más. En algunas realizaciones, el análisis incluye análisis en múltiples puntos temporales. La selección del punto(s) temporal para el análisis se basará en el tipo de análisis que se realizará, tal como entenderá fácilmente el experto en la materia.

El análisis puede incluir medir cualquiera de los parámetros descritos en el presente documento o conocidos en la materia para medir la viabilidad celular, la proliferación celular, la identidad celular, la morfología celular y la función celular, en particular en lo que respecta a las células del sistema inmunitario, por ejemplo, linfocitos T y/o células NK. Por ejemplo, la citometría de flujo puede utilizarse para determinar el número total de células hematopoyéticas o el número de células de un tipo de célula hematopoyética particular. Puede realizarse histoquímica o inmunohistoquímica para determinar el estado apoptótico de las células, por ejemplo, marcado del extremo libre por desoxinucleotidil transferasa terminal dUTP (TUNEL, del inglés, *transferase dUTP nick end labeling*) para medir la fragmentación del ADN o inmunohistoquímica para detectar anexina V que se une a la fosfatidilserina en la superficie celular. La citometría de flujo también puede emplearse para evaluar las proporciones de células diferenciadas y tipos de células diferenciadas, por ejemplo, para determinar la capacidad de las células hematopoyéticas para diferenciarse en presencia del agente. Se pueden realizar ELISA, transferencias de Western y Northern para determinar los niveles de citocinas, quimiocinas, inmunoglobulinas, etc., expresados en el animal no humano SIRPα-IL-15 humanizado injertado, por ejemplo, ratón, por ejemplo, para evaluar la función de las células injertadas. También se pueden realizar ensayos *in vivo* para probar la función de las células inmunitarias, así como ensayos oportunos para enfermedades o trastornos de interés particulares, tales como la diabetes, una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad de injerto contra hospedador, DMS, etc. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Immunology (Richard Coico, ed. John Wiley & Sons, Inc. 2012) e Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997).

Así, por ejemplo, se divulga un método para determinar el efecto de un agente en un patógeno humano, incluida la exposición de un animal no humano SIRPα-IL-15 humanizado injertado, por ejemplo, ratón, por ejemplo, un ratón hSIRPα hIL-15 *Rag2^{-/-}IL2γ^{Y/-}* injertado, a una cantidad eficaz de un patógeno humano, siendo la cantidad eficaz de un patógeno la cantidad de patógeno necesaria para producir una infección en el ratón; que permite al patógeno infectar al ratón; que mide un parámetro de la infección a lo largo del tiempo en presencia del agente; y que compara esa medida con la medida de un animal no humano SIRPα-IL-15 humanizado injertado, por ejemplo, ratón, no expuesto al agente. Se determina que el agente es un agente antipatogénico si reduce la cantidad del agente en la sangre o en un tejido del animal no humano, por ejemplo, ratón, en al menos la mitad después de una sola administración o dos o más administraciones del agente durante un período de tiempo seleccionado.

Como otro ejemplo, se divulga un método para determinar si un aislado o cepa de patógeno de interés es resistente a fármacos, por ejemplo, resistente a múltiples fármacos. En estos métodos, un animal no humano SIRPα-IL-15 humanizado injertado, por ejemplo, ratón, por ejemplo, un ratón hSIRPα hIL-15 *Rag2^{-/-}IL2γ^{Y/-}* injertado, se expone a una cantidad eficaz de un aislado o cepa de patógeno humano de interés, siendo la cantidad eficaz del patógeno la cantidad de patógeno necesaria para producir una infección en el animal no humano, por ejemplo, ratón; se permite que el patógeno infecte al animal no humano; se mide en presencia del fármaco un parámetro de la infección, por ejemplo, el valor del aislado o cepa de interés en la sangre o tejido del animal no humano, la capacidad del aislado o cepa de interés para mantener una infección en el animal no humano, o la capacidad del aislado o cepa de interés para reproducirse en el animal no humano en un punto temporal después de la administración del fármaco; y esa medición se compara con la medición de un animal no humano SIRPα-IL-15 humanizado injertado, por ejemplo, un ratón infectado con patógeno no expuesto al agente. Los ejemplos de fármacos de interés incluyen amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cloranfenicol, ciprofloxacino, cotrimoxazol, ertapenem, imipenem, fluoroquinolonas (por ejemplo, ciprofloxacino, gatifloxacina y ofloxacina), estreptomycin, sulfadiazina, sulfametoxazol,

tetraciclina y una combinación de los mismos. La administración del fármaco o combinación de fármacos puede ser al menos una semana, 10 días, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas después de una exposición productora de la infección al aislado o cepa de interés.

- 5 Además, los ratones SIRP α -IL-15 humanizados y los ratones SIRP α -IL-15 humanizados injertados con células hematopoyéticas humanas, por ejemplo, ratones hSIRP α hIL-15 Rag2^{-/-}IL2ry^{+/+} injertados, y que opcionalmente tienen otras modificaciones genéticas, son útiles para estudiar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por células NK (por ejemplo, células NK humanas). Dichos animales también son modelos útiles para probar la capacidad de los candidatos a fármacos terapéuticos, por ejemplo, proteínas de unión a antígeno o anticuerpos, diseñados para dirigirse a varias células (por ejemplo, tumores o células infectadas) o agentes infecciosos, para activar las vías de las células NK implicadas en la destrucción de dichas células o agentes infecciosos.

- Es ampliamente conocido que uno de los mecanismos subyacentes a la terapia con anticuerpos monoclonales es la activación de las células NK a través de la unión del receptor CD16 de Fc de las células NK (receptor Fc gamma IIIA). Se han realizado intentos para aumentar la afinidad de varios candidatos monoclonales conocidos (por ejemplo, rituximab) por Fc gamma RIIIA para mejorar la ADCC (por ejemplo, Bowles *et al.* Blood 2006; 108:2648-2654; Garff-Tavernier *et al.* Leukemia 2011; 25:202-209). Tal como se demuestra en el presente documento, los animales no humanos injertados SIRP α -IL-15 humanizados producen células NK humanas que son capaces de mediar en la ADCC; y, por tanto, estos animales presentan un modelo *in vivo* útil para estudiar los mecanismos de ADCC y seleccionar varios candidatos terapéuticos.

- Por lo tanto, las células y los ratones SIRP α -IL-15 humanizados injertados, por ejemplo, las células NK humanas, aislado de los mismos, pueden utilizarse en métodos de selección diseñados para identificar agentes que mejoran la actividad de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de un tipo de célula injertada en el ratón o células humanizadas, por ejemplo, células NK humanas. Por ejemplo, un método adecuado puede incluir la administración de un agente a un ratón SIRP α -IL-15 humanizado injertado y la determinación del efecto del agente sobre la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de un tipo de célula injertada *in vivo* en el ratón humanizado. Dicho efecto puede dar como resultado una mejor destrucción de tumores, por ejemplo, de un tumor trasplantado, por ejemplo, de un tumor humano. Dicho efecto puede dar como resultado una mejor destrucción de células infectadas, por ejemplo, células infectadas por virus o células infectadas por bacterias. Dicho efecto puede dar como resultado una mejor destrucción de una bacteria, un hongo o un parásito. El agente puede ser un anticuerpo o una proteína de unión a antígeno. El anticuerpo o la proteína de unión a antígeno pueden diseñarse para dirigirse a un antígeno expresado en una célula tumoral humana. El anticuerpo o la proteína de unión a antígeno pueden diseñarse para dirigirse a un antígeno expresado en una célula infectada por virus o una célula infectada por bacterias. El anticuerpo o la proteína de unión a antígeno pueden diseñarse para dirigirse a un antígeno bacteriano, fúngico o parasitario. En el presente documento se divulga un método *in vitro* en donde las células humanas, por ejemplo, las células NK humanas, se aíslan de un ratón SIRP α -IL-15 humanizado injertado y se ponen en contacto *in vitro* con un agente, tal como un anticuerpo o una proteína de unión a antígeno, y una célula diana (por ejemplo, una célula tumoral) para determinar la eficacia del agente para mediar en la destrucción de la célula diana. El efecto del agente en la actividad citolítica de las células humanas, por ejemplo, las células NK humanas, entonces se puede determinar.

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

45 **MÉTODOS PARA HACER LOS ANIMALES NO HUMANOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS EN CUESTIÓN**

- En el presente documento, que no forma parte de la invención, se divulgan métodos para fabricar los ratones objeto de la presente invención. En la práctica de los métodos divulgados, se genera un animal no humano que incluye una secuencia de ácido nucleico incorporada en el genoma del animal no humano modificado genéticamente, cuya secuencia codifica una proteína SIRP α humana y está unida operativamente a un promotor del gen SIRP α , por ejemplo, un promotor del gen SIRP α endógeno no humano; y una secuencia de ácido nucleico incorporada en el genoma del animal no humano modificado genéticamente, cuya secuencia codifica una proteína IL-15 humana y está unida operativamente a un promotor del gen IL-15, por ejemplo, un promotor del gen IL-15 no humano endógeno.

- La generación de un animal no humano que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína SIRP α humana y está unida operativamente a un promotor SIRP α y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína IL-15 humana y está unida operativamente a un promotor del gen IL-15, puede lograrse mediante cualquier método conveniente para hacer animales modificados genéticamente, por ejemplo, como se conoce en la materia o como se describe en el presente documento.

- Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una proteína SIRP α humana o una proteína IL-15 humana puede incorporarse en un vector recombinante de forma adecuada para la inserción en el genoma de la célula hospedadora y la expresión de la proteína humana en una célula hospedadora no humana. El vector recombinante puede incluir la una o más secuencias reguladoras unidas operativamente al ácido nucleico que codifica la proteína humana de una manera que permite la transcripción del ácido nucleico en ARNm y la traducción del ARNm en la proteína humana,

como se ha descrito anteriormente. Debe entenderse que el diseño del vector puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar y/o la cantidad de proteína humana a expresar.

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

Por ejemplo, los animales modificados genéticamente en cuestión se pueden crear mediante la introducción del ácido nucleico que codifica la proteína humana en un ovocito, por ejemplo, mediante microinyección, y permitiendo que el ovocito se desarrolle en un animal de acogida hembra.

El ácido nucleico puede inyectarse en ovocitos fertilizados. Los ovocitos fertilizados se pueden recoger de hembras superovuladas el día después del apareamiento e inyectarse con la construcción de expresión. Los ovocitos inyectados se cultivan durante la noche o se transfieren directamente a oviductos de hembras pseudoembarazadas 0,5 días p.c. Los métodos para la superovulación, la recogida de ovocitos, la inyección de la construcción de expresión y la transferencia de embriones son conocidos en la materia y se describen en *Manipulating the Mouse Embryo* (2002, *A Laboratory Manual*, 3.ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press). La descendencia se puede evaluar para determinar la presencia del ácido nucleico introducido mediante análisis de ADN (por ejemplo, PCR, transferencia de Southern, secuenciación de ADN, etc.) o mediante análisis de proteínas (por ejemplo, ELISA, transferencia de Western, etc.).

Como otro ejemplo, la construcción que incluye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína humana puede transfectarse en células madre (por ejemplo, células ME o células MPi) mediante métodos bien conocidos, tales como electroporación, precipitación con fosfato de calcio, lipofección, etc. Las células se pueden evaluar para determinar la presencia del ácido nucleico introducido mediante análisis de ADN (por ejemplo, PCR, transferencia de Southern, secuenciación de ADN, etc.) o mediante análisis de proteínas (por ejemplo, ELISA, transferencia de Western, etc.). Las células que se ha determinado que han incorporado la construcción de expresión se pueden introducir después en embriones de preimplantación. Para una descripción detallada de los métodos conocidos en la materia útiles para las composiciones y métodos de la invención, véase Nagy *et al.*, (2002, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 3.ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Nagy *et al.* (1990, *Development* 110:815-821), la patente de EE. UU. n.º 7.576.259, la patente de EE. UU. n.º 7.659.442, la patente de EE. UU. n.º 7.294.754 y Kraus *et al.* (2010, *Genesis* 48:394-399).

Un método para generar un animal modificado genéticamente descrito en el presente documento puede utilizar una construcción dirigida hecha con la tecnología VELOCIGENE®, mediante la introducción de la construcción en células ME y la introducción de los clones de células ME dirigidos en un embrión de ratón con la tecnología VELOCIMOUSE®, como se describe en los ejemplos.

Los animales modificados genéticamente iniciales pueden cruzarse con animales adicionales que lleven la modificación genética. Por ejemplo, los animales no humanos SIRPα humanizados pueden cruzarse con animales no humanos IL-15 humanizados de la misma especie para producir los animales no humanos hSIRPα-hIL-15 descritos en el presente documento. Los animales genéticamente modificados que portan un ácido nucleico que codifica la(s) proteína(s) humana(s) de la presente divulgación pueden cruzarse además con animales inactivados, por ejemplo, un animal no humano que es deficiente para una o más proteínas, por ejemplo, que no expresa uno o más de sus genes, por ejemplo, un animal deficiente en Rag2 y/o un animal deficiente en IL2ry.

Como se ha comentado anteriormente, el animal no humano genéticamente modificado en cuestión es un animal inmunodeficiente. Los animales no humanos genéticamente modificados que son inmunodeficientes e incluyen una o más proteínas humanas, por ejemplo, hSIRPα y/o hIL-15, pueden generarse mediante cualquier método conveniente para la generación de animales modificados genéticamente, por ejemplo, como se conoce en la materia o como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la generación del animal inmunodeficiente modificado genéticamente se puede lograr mediante la introducción del ácido nucleico que codifica la proteína humana en un ovocito o células madre que incluye un alelo del gen *SCID* mutante que, cuando es homocigoto, dará como resultado inmunodeficiencia como se describe con mayor detalle anteriormente y en los ejemplos de trabajo del presente documento. A continuación, los ratones se generan con el ovocito modificado o las células ME utilizando, por ejemplo, los métodos descritos en el presente documento y conocidos en la materia, y se aparean para producir los ratones inmunodeficientes que incluyen la modificación genética deseada. Como otro ejemplo, los animales no humanos

modificados genéticamente se pueden generar en un entorno inmunocompetente y cruzarse con un animal que incluya un alelo del gen mutante que, cuando es hemicigoto u homocigoto, dará como resultado la inmunodeficiencia, y la progenie se apareará para crear un animal inmunodeficiente que exprese la al menos una proteína humana de interés.

- 5 El ratón modificado genéticamente puede tratarse para eliminar las células hematopoyéticas endógenas que pueden existir en el animal no humano modificado genéticamente. El tratamiento puede incluir la irradiación del ratón modificado genéticamente. Las crías de ratón genéticamente modificadas recién nacidas pueden recibir radiación subletal. Las crías recién nacidas pueden irradiarse 2×200 cGy con un intervalo de cuatro horas.
- 10 Diversas realizaciones de la invención proporcionan animales genéticamente modificados que incluyen un ácido nucleico humano en sustancialmente todas sus células, así como animales genéticamente modificados que incluyen un ácido nucleico humano en algunas, pero no en todas sus células. En algunos casos, por ejemplo en la recombinación dirigida, una copia del ácido nucleico humano se integrará en el genoma de los animales modificados genéticamente. En otros casos, por ejemplo en la integración aleatoria, múltiples copias, adyacentes o distantes entre sí, del ácido nucleico humano pueden integrarse en el genoma de los animales modificados genéticamente.

Por lo tanto, el ratón modificado genéticamente en cuestión es un animal inmunodeficiente que incluye un genoma que incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido humano unido operativamente al correspondiente promotor animal no humano, en donde el animal expresa el polipéptido humano codificado. En otras palabras, el animal no humano inmunodeficiente genéticamente modificado en cuestión incluye un genoma que incluye un ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido humano, en donde el ácido nucleico está unido operativamente al correspondiente promotor no humano y a una señal de poliadenilación, y en donde el animal expresa el polipéptido humano codificado.

REACTIVOS, DISPOSITIVOS Y KITS

- 25 También se divulgan reactivos, dispositivos y kits de los mismos para practicar uno o más de los métodos descritos anteriormente. Los reactivos, dispositivos y kits de los mismos pueden variar mucho.

Los reactivos o kits pueden incluir uno o más agentes para su uso en los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, el kit puede incluir un animal no humano SIRP α -IL-15 humanizado, por ejemplo, ratón, por ejemplo, un ratón hSIRP α hIL-15 Rag2^{-/-}IL2 γ ^{Y/-}. El kit puede incluir reactivos para la cría de animales no humanos SIRP α -IL-15 humanizados, por ejemplo, ratones, por ejemplo, cebadores y, en algunos casos, reactivos para el genotipado de animales no humanos SIRP α -IL-15 humanizados, por ejemplo, ratones. El kit puede incluir células hematopoyéticas humanas o una población enriquecida de células progenitoras hematopoyéticas humanas para el trasplante en el animal no humano SIRP α -IL-15 humanizado, por ejemplo, un ratón, o reactivos para preparar una población de células hematopoyéticas o una población enriquecida de células hematopoyéticas de un ser humano para el trasplante en un animal no humano SIRP α -IL-15 humanizado, por ejemplo, un ratón. Otros reactivos pueden incluir reactivos para determinar la viabilidad y/o la función de las células hematopoyéticas o de las células inmunitarias diferenciadas (por ejemplo, linfocitos T y/o células NK), por ejemplo, en presencia/ausencia del agente candidato, por ejemplo, uno o más anticuerpos que son específicos para marcadores expresados por diferentes tipos de células hematopoyéticas o células inmunitarias diferenciadas (por ejemplo, linfocitos T y/o células NK), o reactivos para detectar citocinas particulares, quimiocina, etc. Otros reactivos pueden incluir medios de cultivo, complementos de cultivo, composiciones de matriz o similares.

Además de los componentes anteriores, los kit objeto de la invención pueden incluir además instrucciones para la práctica de los métodos objeto de la invención. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits objetos de la invención en una diversidad de formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que pueden estar presentes estas instrucciones es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, por ejemplo, uno o más trozos de papel en los que se imprime la información, en el envase del kit, en un prospecto, etc. Otro medio más sería un medio legible por ordenador, por ejemplo, disquete, CD, etc., en el que se ha grabado la información. Otro medio más que puede estar presente es la dirección de un sitio web que puede utilizarse a través de Internet para acceder a la información en un sitio remoto. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

- 55 Los aspectos, incluidas las realizaciones, de la presente materia descritos anteriormente puede ser beneficiosos solos o en combinación con uno o más aspectos o realizaciones.

Ejemplos

- 60 Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completa de cómo producir y usar la presente invención y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención y tampoco pretenden representar que los experimentos presentados a continuación sean todos o los únicos experimentos llevados a cabo. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión en relación con los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio ponderal, la temperatura es en grados centígrados y la presión es atmosférica o cercana
- 65

a la atmosférica.

Ejemplo 1: Generación de ratones insertados SIRPα humanizados (SRG)

- 5 Se generó un ratón insertado SIRPα humano, que expresa el dominio extracelular de SIRPα humana unido operativamente al promotor de SIRPα de ratón (véase la figura 1). Se sabe que la SIRPα humana existe en al menos 10 formas alélicas. En este ejemplo particular, se emplea la variante 1 de SIRPα humana para humanizar un gen *SIRPα* endógeno de un ratón.

10 **Materiales y métodos**

La generación de ratones insertados que codifican SIRPα humana en el entorno genético de 129xBalb/c Rag2^{-/-} IL2ry^{Y/-} (N2) se realizó con tecnología VELOCIGENE® como se describe en mayor detalle a continuación. Los ratones se mantuvieron en condiciones sin patógenos específicos y con tratamiento continuo de enrofloxacin en el agua de bebida (Baytril; 0,27 mg/ml).

Se construyó un vector dirigido para la humanización de una región extracelular de un gen *SIRP* (por ejemplo, *SIRPα*) mediante tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 6.586.251 y Valenzuela *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659).

En resumen, el clon bMQ-261H14 del cromosoma artificial bacteriano (BAC, del inglés *bacterial artificial chromosome*) de ratón se modificó para eliminar la secuencia que contenía los exones 2 a 4 de un gen *SIRPα* endógeno e insertar los exones 2 a 4 de un gen *SIRPα* humano usando el clon BAC humano CTD-3035H21. El ADN genómico correspondiente a los exones 2 a 4 de un gen *SIRPα* endógeno (-8555 pb) se reemplazó en el clon bMQ-261H14 del BAC por un fragmento de ADN de -8581 pb que contenía los exones 2 a 4 de un gen *SIRPα* humano del clon CTD-3035H21 del BAC. El análisis de secuencia del alelo SIRPα humano contenido en el clon CTD-3035H21 del BAC reveló que el alelo corresponde a la variante 1 humana. Se añadió un casete de neomicina flanqueado por los sitios loxP al final del fragmento de ADN humano de -8581 pb que contenía los exones 2 a 4 del gen *SIRPα* humano (Figura 1 (abajo)).

Se obtuvieron brazos de homología cadena arriba y cadena abajo a partir de ADN del BAC de ratón en las posiciones 5' y 3' de los exones 2 y 4, respectivamente, y se añadieron al casete de neomicina-fragmento humano de -8581 pb para crear el vector de direccionamiento final para la humanización de un gen *SIRPα* endógeno, que contenía de 5' a 3' un brazo de homología en 5' que contenía 19 kb de ADN de ratón en 5' del exón 2 del gen *SIRPα* endógeno, un fragmento de ADN de -8581 pb que contiene los exones 2 a 4 de un gen *SIRPα* humano, un casete de neomicina flanqueado por sitios loxP y un brazo de homología en 3' que contenía 21 kb de ADN de ratón en 3' del exón 4 de un gen *SIRPα* endógeno. La inserción dirigida del vector de direccionamiento colocó el casete de neomicina en el quinto intrón de un gen *SIRPα* de ratón entre los exones 4 y 5. El vector de direccionamiento se linealizó mediante digestión con Swal y después se utilizó en la recombinación homóloga en células bacterianas para lograr un reemplazo dirigido de los exones 2 a 4 en un gen *SIRPα* de ratón con los exones 2 a 4 de un gen *SIRPα* humano (Figura 1 (abajo)).

El ADN diana del BAC (descrito anteriormente) se utilizó para electroporar células ME de ratón Rag2^{-/-} IL2ry^{Y/-} para crear células ME modificadas que incluyen un reemplazo de los exones 2 a 4 en un gen *SIRPα* de ratón endógeno con un fragmento genómico que incluye los exones 2 a 4 de un gen *SIRPα* humano. Las células ME positivas que contienen un fragmento genómico que incluye los exones 2 a 4 de un gen *SIRPα* humano se identificaron mediante PCR cuantitativa usando sondas TAQMAN™ (Lie y Petropoulos, 1998. Curr. Opin. Biotechnology 9:43-48). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción cadena arriba incluyó lo siguiente, que indica la secuencia endógena de ratón cadena arriba del punto de inserción (contenida en los paréntesis siguientes) unida de forma contigua a la secuencia genómica SIRPα humana presente en el punto de inserción:

(AGTCTCCTACCACTAGACTGCTGAGACCCGCTGCTCTGCTCAGGACTCG
ATTTCCAGTACACAATCTCCCTCTTTGAAAAGTACCACACATCCTGGGGT)
GCTCTTGCAATTTGTGTGACACTTTGCTAGCCAGGCTCAGTCCTGGGTTCCA
GGTGGGGACTCAAACACACTGGCAGGAGTCTACATTGGATATTCTTGGT (SEQ ID NO: 1). La secuencia de
nucleótidos a través del punto de inserción cadena abajo en el extremo 5' del casete de neomicina incluía lo siguiente,
que indica la secuencia genómica SIRPα humana contigua a la secuencia del casete cadena abajo del punto de
inserción (contenida entre paréntesis a continuación con la secuencia loxP en cursiva):
GCTCCCCATTCTCACTGGCCAGCCCTCTCCCTACTCTTTCTAGCCCT
GCCTCATCTCCCTGGCTGCCATTGGGAGCCTGCCCCACTGGAAGCCAG(TC
GAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATATGGCCTCCGCGC
CGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCCCTCCTCACGGCGA) (SEQ ID NO: 2). La secuencia de nucleótidos
a través del punto de inserción cadena abajo en el extremo 3' del casete de neomicina incluía lo siguiente, que indica
la secuencia del casete contigua a la secuencia genómica de ratón en 3' del exón 4 de un gen *SIRPα* endógeno
(contenida entre paréntesis a continuación):
CATTCTCAGTATTGTTTTGCAAGTTCTAATTCCATCAGACCTCGACCTGC
AGCCCCTAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGCTAGC(T

GTCTCATAGAGGCTGGCGATCTGGCTCAGGGACAGCCAGTACTGCAAAGA

GTATCCTTGTTTCATACCTTCTCCTAGTGGCCATCTCCCTGGGACAGTCA) (**SEQ ID NO: 3**). Después se utilizaron clones de células ME positivas para implantar ratones hembra mediante el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.294.754 y Poueymirou *et al.*, 2007, F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses, Nature Biotech. 25(1):91-99) para generar una camada de crías que contenían una inserción de los exones 2 a 4 de un gen *SIRPα* humano en un gen *SIRPα* endógeno de ratón.

Las células ME dirigidas descritas anteriormente se utilizaron como células ME donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en la fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (anteriormente citado). Los ratones portadores de la humanización de los exones 2 a 4 de un gen *SIRPα* endógeno se identificaron mediante genotipado utilizando un ensayo de modificación de alelos (Valenzuela *et al.*, citado anteriormente) que detectó la presencia de las secuencias del gen *SIRPα* humano.

Los ratones que portan la construcción del gen *SIRPα* humanizado (es decir, que contienen los exones 2 a 4 de *SIRPα* humano en un gen *SIRPα* de ratón) se pueden cruzar con una cepa de ratón con eliminación de Cre (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente internacional n.º WO 2009/114400) a fin de eliminar cualquier casete de neomicina con lox introducido mediante el vector de direccionamiento que no se elimina, por ejemplo, en la fase de célula ME o en el embrión. Opcionalmente, se conserva el casete de neomicina en los ratones. Para obtener ratones *Sirpα* homocigotos se crían heterocigotos.

Resultados

Los ratones que incluyen un ácido nucleico que codifica una versión humanizada del gen *SIRPα* de ratón como se describe anteriormente (ratones SRG) muestran expresión fisiológica de una proteína *SIRPα* humanizada (datos no mostrados). Estos ratones también muestran un injerto de células inmunitarias humanas en el bazo, los ganglios linfáticos (GL) periféricos y el timo comparable al de los ratones NOD scid gamma (NSG) (datos no mostrados).

Ejemplo 2: Generación de ratones SRG IL-15^{h/h} (SRG-15) humanizados insertados

Se ha demostrado que la citocina IL-15 es importante para el desarrollo de células NK de ratón y para la diferenciación y mantenimiento de linfocitos T CD8⁺ de memoria. Para estudiar los efectos de la IL-15 humana en el desarrollo, diferenciación y mantenimiento de células inmunitarias humanas en el contexto de un modelo animal, se generaron ratones insertados para *SIRPα* humana con IL-15 humana como se describe con mayor detalle a continuación. En la figura 2 se muestra una representación esquemática de la construcción insertada de IL-15.

Materiales y métodos

Las células ME de ratón se modificaron para reemplazar la secuencia del gen *IL-15* de ratón por la secuencia del gen *IL-15* humano en el locus endógeno de *IL-15* de ratón, bajo el control de los elementos reguladores de la *IL-15* de ratón, mediante tecnología de ingeniería genética de VELOCIGENE®, para producir un locus humanizado como se muestra en la figura 2. Se generaron ratones insertados que comprendían *IL-15* humana en entornos genéticos 129xBalb/c Rag2^{-/-} IL2ry^{+/+}. En la figura 2 no se muestra cadena arriba (en relación con la dirección de la transcripción del gen *IL-15*) los exones no traducidos en 5' del gen de ratón (exones 1 y 2); el exón 1 de codificación (exón 3) de la figura 2 muestra una pequeña región no traducida (sin relleno) cadena arriba del exón de codificación. Excepto como se indica a continuación para el ratón 1, como se muestra en la humanización en la parte inferior de la figura 2, se retuvieron los exones 1 y 2 de codificación de ratón (exones 3 y 4), mientras que los exones 3 a 6 de codificación del ratón (exones 5 a 8) se reemplazaron por los exones 3 a 6 de codificación humanos (exones 5 a 8). En el extremo cadena abajo, el exón 6 de codificación humano (exón 8) va seguido de un codón de parada y una 3'-UTR humana, y además por una secuencia humana que se encuentra cadena abajo de la 3'UTR humana. A efectos de selección, se incluyó un casete de selección (floxado para que Cre lo eliminara). El locus humanizado de la figura 2 expresa una proteína IL-15 madura que es completamente humana.

Específicamente, se realizó una recombinación homóloga bacteriana (RHB) para construir un vector de direccionamiento grande (LTVEC, del inglés *large targeting vector*) que contenía secuencias del gen *IL-15* humano para dirigirse al locus de *IL-15* de ratón utilizando técnicas de RHB convencionales (véase, por ejemplo, Valenzuela *et al.* (2003), citado anteriormente) y reparación de brechas por RHB. Los fragmentos lineales se generaron mediante la unión de las cajas de homología generadas por PCR con casetes clonados, seguido del aislamiento en gel de los productos de unión y la electroporación en bacterias competentes para RHB que albergan el cromosoma artificial bacteriano (BAC) diana. El PRC123-203P7 del BAC de ratón se utiliza como fuente de secuencia de ratón; el RP11-103B12 del BAC humano se utiliza como fuente de la secuencia del gen *IL-15* humano. Después de una etapa de selección, los clones correctamente recombinados se identifican mediante PCR a través de uniones novedosas y mediante análisis de restricción. Se preparó un LTVEC que contenía brazos de homología y secuencias del gen *IL-15* humano.

El gen *IL-15* de ratón (GenelD de ratón: 103014; RefSeq transcript: NM_008357.2; ensembl eID: 16168) se modifica

mediante el uso de coordenadas genómicas para la eliminación GRCM38: cr 8: 82331173-82343471 (hebra negativa); coordenadas genómicas para el reemplazo GRCh37: cr 4: 142642924-142655819 (hebra positiva). 12299 nucleótidos de la secuencia de ratón se reemplazaron por 12896 nucleótidos de la secuencia humana. El reemplazo de la secuencia de IL-15 de ratón como se describe anteriormente se presenta gráficamente en la figura 2.

- 5 El LTVEC que incluía el gen *IL-15* humanizado tenía aproximadamente 13 kb de brazo de direccionamiento de ratón cadena arriba flanqueado cadena arriba con un sitio MluI, y un brazo de direccionamiento de ratón cadena abajo de 27 kb flanqueado cadena abajo con un sitio Ascl. El LTVEC se linealizó con MluI y Ascl mediante electroporación.
- 10 Tras la construcción del LTVEC, la secuencia de nucleótidos del LTVEC a través de la unión en 5' de ratón/humano y la unión en 3' de humano/ratón se muestra en la tabla 1 a continuación. La **SEQ ID NO: 4** representa la unión cadena arriba (en relación con la dirección de la transcripción del gen *IL-15*) entre la secuencia de ratón y la secuencia humana; la secuencia que se muestra comienza con la secuencia del ratón en mayúsculas, seguido de un sitio de restricción
- 15 **Ascl** en minúsculas, seguido de la secuencia de ácido nucleico de IL-15 humana en mayúsculas. La **SEQ ID NO: 5** indica la secuencia codificante y no codificante de IL-15 humana cadena abajo en mayúsculas (3'UTR humana en **negrita y cursiva**), seguido de un sitio XhoI en minúsculas, seguido de un sitio lox (mayúsculas, **cursiva y negrita**), seguido de la secuencia del casete de selección neo cadena abajo (mayúsculas), que se extiende 2,6 kb cadena abajo (no se muestra). La **SEQ ID NO: 6** es una secuencia de ácido nucleico que representa la unión entre la parte cadena
- 20 **abajo** del casete de selección neo (mayúsculas), con el sitio lox (mayúsculas y **negrita cursiva**), seguido de un sitio NheI (en minúsculas), a la que sigue la secuencia de ratón cadena abajo de la humanización (en mayúsculas); el casete de selección se extiende 2,6 kb cadena arriba.

Tabla 1: Secuencias de unión del locus IL-15 humanizado

SEQ ID NO	Secuencia
SEQ ID NO: 4	ATCCATTTAGCCTTTCTCTGATCACTAAGTTGGACAGTTGGA CAGTCTTCCTCAAATTAGCTTAGACTATCAAAATTATACTGT ATTTTTGGTATTTCCAgcgatcgcTTCAGTTACAAGGCTGTTGAA TGCACAGAAGCAAGGATAACACTGATTTTTTCACTGGTCAG AATAAAAATTATTGATTGCTCTTTTGCTTATAGTATTC

(continuación)

SEQ ID NO	Secuencia
SEQ ID NO: 5	AATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGG AGGAAAAAATATTAAGAATTTTGCAGAGTTTGTACAT ATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTGATTGCAATTGATT CTTTTAAAGTGTTTCTGTTATTAACAAACATCACTCTGCTG CTTAGACATAACAAAACACTCGGCATTTCAAATGTGCTGTCA AAACAAGTTTTTCTGTCAAGAAGATGATCAGACCTTGGATCA GATGAACTCTTAGAAATGAAGGCAGAAAAATGTCATTGAGTA ATATAGTGACTATGAACTTCTCTCAGACTTACTTTACTCATTT TTTAATTTATTATTGAAATTGTACATATTTGTGGAATAATGT AAAATGTTGAATAAAAAATATGTACAAGTGTTGTTTTTAAGTT GCACTGATATTTTACCTCTTATTGCAAAATAGCATTTGTTTAA GGGTGATAGTCAAATTATGTATTGGTGGGGCTGGGTACCAAT GCTGCAGGTCAACAGCTATGCTGGTAGGCTCCTGCCAGTGTG GAACCACTGACTACTGGCTCTCATTGACTTCCTTACTAAGCAT AGCAAAACAGAGGAAGAATTTGTTATCAGTAAGAAAAAGAAGA ACTATATGTGAATCCTCTTCTTTATACTGTAATTTAGTTATTG ATGTATAAAGCAACTGTTATGAAATAAAGAAATTGCAATAACT GGCATATAATGTCCATCAGTAAATCTTGGTGGTGGTGGCAA TAATAAACTTCTACTGATAGGTAGAATGGTGTGCAAGCTTG TCCAATCACGGATTGCAGGCCACATGCGGCCCAAGGACAAC TTGAATGTGGCCCAACACAAATTCATAAACTTTTCATACATCT CGTTTTTAGCTCATCAGCTATCATTAGCGGTAGTGTATTAA AGTGTGGCCCAAGACAATTCTTCTTATTCCAATGTGGCCCA GGGAAATCAAAGATTGGATGCCCTGGTATAGAAAATA ATAGTGACAGTGTTTCATATTTTCATGCTTTCCCAAATACAGGT

(continuación)

SEQ ID NO	Secuencia
Tabla 1 cont. SEQ ID NO: 5 Cont.	ATTTTATTTTCACATTCTTTTGGCCATGTTTATATAATAATAA AGAAAAACCCTGTTGATTGTTGGAGCCATTGTTATCTGAC AGAAAATAATTGTTTATATTTTTGCACTACACTGTCTAAAA TTAGCAAGCTCTCTTCTAATGGAAGTGTAAAGAAAGATGAAA TATTTTTGTTTTATTATAAATTTATTTACCTTAATTCTGGTA ATACTCACTGAGTGAAGTGTGGGGTGGGAAATGATCTCTTAA GAATTTGATTCTTTCTATTCCATAGTACAAACTCGTTCTCT GTTGAAACATTCTTCTATCACCCAGTGCCCTATCCATGTAC ATGTGTTCTTATTGCTCTAGTCAAACGGTGCTTATAAATATC TTTCAGAAAGTTTAGGAGAAATCTGTATCCTATTTGACTTCC AATAATCATGTATTGGCTGTCAGCTTCTTACCTACTCTCAGT CCAGAGAAATAGTATTTGGCAGCCACTCTTTAAAGTTTATG GGTGTGGATTGTGGCGGTTGATTTATTTTTTTTATTCAATT GGGATAGAATTTTTTAATATACCTGTATTTTTGTTTTGTTTTA TGTAGCTTTTCTATTAGGGAGAGTAGGAAAAGTGCACCATT TTCTTCTCTAAATTTCCAGTCCAGTCTTAGGGGAATGTTAG TCTTCCTGAGATGGGGGAAGGAAAATCATAATGCCAGTCAC TTTGCAAATAATTTTTATAGTGATAAATGGTTCATTTTGGT TACATAGGCATACAAGTGGGCTTAAAACTTGGAATTTACCA GGGCTCAAAATTAAAATTCTTACATTAGTTACTCGATATGG ATCGCTTCAGTTGATCTTAGAAAACCAAGGCATAGATCTG CAACctcgag ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATA TGCATGGCCTCCGCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCG CCCCCCTCCTCACGGCG
SEQ ID NO: 6	CATTCTCAGTATTGTTTTGCCAAGTTCTAATTCCATCAG ACCTCGACCTGCAGCCCCCTAG ATAACTTCGTATAATGT ATGCTATACGAAGTTAT _{gctagc} GTGATAGTCCTTCACG GAAAGTACAAGAATACACAGAAAACCTGCTGTTTACATT AGTCTTTCACGTTTTTTATTTATTCTCACAAATTTTAATGCAA TAC

Las células ME de ratón se sometieron a electroporación con las construcciones LTVEC, crecieron en medio de selección y se utilizaron como células ME donantes para producir ratones IL-15 humanizados que incluían un reemplazo en el locus de IL-15 de ratón endógeno por la secuencia humana como se representa en la figura 2. Después de la electroporación de la célula ME, se realiza un ensayo de pérdida de alelo nativo (véase, por ejemplo, *Valenzuela et al.* (2003), citado anteriormente) para detectar la pérdida de la secuencia de IL-15 endógena debido al direccionamiento.

Las células ME correctamente dirigidas se electroporaron adicionalmente con un vector transitorio que expresa Cre para eliminar el casete de selección de fármaco Neo.

Con el método VELOCIMOUSE® se introdujeron células ME de ratón donante, incluido un locus humanizado de IL-15, en embriones de ratón en etapa inicial (Poueymirou *et al.* (2007) F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses, *Nat Biotechnol* 25:91-99). Se obtuvieron ratones heterocigotos y se criaron heterocigotos para obtener homocigotos en relación con la IL-15 humanizada. Se generaron dos versiones de ratones IL-15 humanizados (denominados aquí ratón 1 y ratón 2). Tras un análisis más detallado, se encontró que la versión de ratón 1 contenía una duplicación de exón en su genoma. En el ratón 2, el locus de IL-15 de ratón endógeno se reemplazó por la secuencia humana como se representa en la figura 2.

Los niveles de ARNm de IL-15 humana se determinaron como sigue. Se realizó qPCR con retrotranscripción (RT) utilizando un sistema de PCR en tiempo real rápido 7500 (Applied Biosystems) y un kit de qPCR universal SYBR® FAST (KAPA Biosystems). Los cebadores de oligonucleótidos específicos de secuencia se diseñaron utilizando el programa informático Primer3 y se sintetizaron por Sigma-Aldrich. Se usaron los siguientes cebadores: *Hprt* de ratón directo: 5'-AGGGATTGTAATCACGTTTG-3' (SEQ ID NO: 7), *Hprt* de ratón inverso: 5'-TTTACTGGCAACATCAACAG-3' (SEQ ID NO: 8); *IL15* humano directo: 5'-GCCCAGGGAAATCAAAAGAT-3' (SEQ ID NO: 9), *IL15* humano inverso: 5'-TGGCTCCAACAAATCAACAG-3' (SEQ ID NO: 10). Los valores de expresión relativa se calcularon utilizando el método de ciclo de umbral comparativo y se normalizaron a *Hprt* de ratón.

Los ratones SRG-15 se generan mediante (1) reproducción de ratones que comprenden el reemplazo de SIRPα humana con ratones que comprenden el reemplazo de IL-15 humana, ambos con entorno Rag2^{-/-} IL2ry^{Y/-}, o (2) la introducción de un gran vector dirigido que comprende IL-15 humana en una célula ME que alberga el reemplazo de SIRPα humana en el entorno Rag2^{-/-} IL2ry^{Y/-} (descrito en el ejemplo 1) y la generación de ratones a partir de células ME que albergan reemplazos de genes *IL-15* y *SIRPα* humanos, así como Rag2^{-/-} IL2ry^{Y/-} utilizando el método VELOCIMOUSE®. Los ratones heterocigotos se crían en homocigosidad.

Resultados

Como se ilustra en las figuras 3A y 3B, se encontraron niveles elevados de expresión de ARNm de IL-15 humana en el hígado, pulmón, médula ósea (MO), intestino delgado (ID) y colon de ratón 1 SRG-15 no injertado. De manera similar, se encontraron niveles elevados de ARNm de IL-15 humana en el hígado, pulmón e intestino delgado de ratón 2 SRG-15 no injertado (Figura 3B). Tal como se muestra en la figura 4, tras la estimulación con poli (I:C), también se pudieron detectar niveles elevados de proteína IL-15 humana en el suero del ratón 2 SRG-15, en donde los exones humanos 5 a 8 reemplazan los exones de ratón endógenos.

Ejemplo 3: Injerto de ratones SRG-15

Materiales y métodos

Los ratones SRG y SRG-15 se injertan como se describe a continuación. Los ratones recién nacidos se irradian subletalmente sin anestesia 3 a 5 días después del nacimiento con 160 cGy y se devuelven a sus madres para que descansen. 4 a 12 horas después de la irradiación, estos neonatos se les trasplantan huHSC CD34+ en 25 µl de PBS por vía intrahepática (i.h.) utilizando una aguja de 30G.

Resultados

Para evaluar el impacto de la IL-15 humana en el desarrollo de células inmunitarias, se comparó el injerto de células CD45⁺ humanas en ratones NSG, SRG y SRG-15. Se observó un injerto eficaz de células hematopoyéticas humanas en la sangre de ratones NSG, SRG y SRG-15 (ratón 2) 12 a 14 semanas después del injerto como se muestra en la figura 5A. En la figura 5B se proporciona una comparación que muestra el injerto como lo demuestran los números de células CD45⁺ humanas en la MO bazo, GL, hígado y pulmón de SRG y SRG-15 (ratón 2) 14 semanas después del injerto.

En el ratón 1, aunque el injerto de células CD45⁺ humanas no fue diferente, se encontró un mayor porcentaje y número de células NK humanas en varios tejidos en ratones SRG-15 en comparación con ratones SRG, como se ilustra en las figuras 6A y 6B. La IL-15 no solo es importante para el desarrollo y la supervivencia de las células NK, sino también para su maduración. Como se muestra en la figura 6C, las células NK humanas en el hígado de los ratones SRG-15 (ratón 1) tenían un nivel de expresión más elevado de CD16 y CD56, lo que indica una mayor maduración de las células NK en ratones SRG-15 en comparación con ratones SRG. Ambos subconjuntos de células NK humanas, CD56^{brillante}CD16⁻ y CD56^{oscuro}CD16⁺, se encontraron presentes en la sangre, bazo e hígado de ratones SRG-15, como se muestra en la figura 6D (bazo) (y datos no mostrados). Además, como se muestra en la figura 6D, el análisis de los dos subconjuntos de células NK humanas en el bazo de ratones SRG-15 (ratón 1) mostró que tenían un nivel de expresión distinto de receptores inhibidores citolíticos, con la población de células NK CD56^{oscuro}CD16⁺ que incluye el mayor porcentaje de células que expresan CD158. Esto se asemeja a lo que se encuentra para los subconjuntos de células NK en la sangre de seres humanos (datos no mostrados).

Para el ratón 2 SRG-15, se observó un injerto eficaz de células NK humanas en tejidos linfoides y no linfoides como se muestra en las figuras 7A a 7D. En las figuras 7A y 7B se muestra el porcentaje de células NK en sangre y bazo,

respectivamente. En las figuras 7C y 7D se muestra la frecuencia de las células NK humanas en la sangre, bazo (B), hígado y pulmón de ratones SRG y SRG-15 (ratón 2) 14 semanas después del injerto. En las figuras 8 y 9A respectivamente se proporcionan datos adicionales que muestran la distribución y el porcentaje de células NK en la sangre y el bazo de ratones SRG y SRG-15 (ratón 2) de diferentes experimentos. En la figura 9B se muestra un aumento en el fragmento hNKp46 de células hCD45⁺ en la sangre de ratones SRG-15 (ratón 2). En las figuras 9C a 9E se muestran números relativos, distribución y composición de células hCD45⁺ en el timo de ratones SRG y SRG-15 (ratón 2).

Se caracterizaron los subconjuntos de células NK en seres humanos y ratones SRG-15 (ratón 2). Como se muestra en las figuras 10A y 10B, se observó el aumento de los niveles de hCD-56^{brillante} hCD16⁻ y hCD56^{oscuro} hCD16⁺ en la sangre y el bazo de los ratones SRG-15 en relación con los ratones SRG. Al igual que en seres humanos, se observó expresión de receptores inhibidores citolíticos (KIR) en subconjuntos de células NK en ratones SRG-15 (ratón 2) (Figura 10C). En la figura 10C se muestran células NK CD56^{brillante} CD16⁻ (recuadro izquierdo de cada gráfico) y células NK CD56^{oscuro} CD16⁺ (recuadro derecho de cada gráfico). El siguiente histograma muestra la expresión de CD158 en esos subconjuntos. CD158 (KIR2D) en los subconjuntos de células NK en ratones SRG-15 es similar a lo que se observa en células NK procedentes de PBMC humanas.

La distribución de las células NK humanas en la sangre de ratones SRG-15 se comparó con la de la sangre obtenida de dos donantes humanos sanos. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de capas leucocitarias de dos donantes individuales (obtenidas de BioreclamationIVT, Westbury, NY) sobre Ficoll-Paque; aunque se observó un mayor porcentaje de células NK en sangre en ratones SRG-15 injertados que en PBMC de donantes humanos, se observó una distribución fisiológicamente comparable de células NK citotóxicas (CD16⁺) frente a células NK productoras de IFN- γ (CD16⁻) (Figura 11).

Por último, un análisis de la médula ósea de SRG y SRG-15 (ratón 2) mostró un mayor desarrollo de células NK humanas en ratones SRG-15 en relación con ratones SRG (Figura 12).

También se evaluó el impacto de la IL-15 humana en el desarrollo de linfocitos T humanos en ratones SRG-15. Una comparación de ratones SRG-15 (ratón 1) con ratones SRG mostró que el efecto de la IL-15 humana en el porcentaje, el número y/o proporción de linfocitos T varió dependiendo del tejido (Figura 13A). El tamaño y la cantidad de ganglios linfáticos en la semana 16 después del injerto no difirieron entre los ratones SRG y SRG-15, lo que confirma los resultados de que el número de linfocitos T humanos en los ganglios linfáticos de ratones SRG y SRG-15 (ratón 1) era similar (Figura 13A). En la figura 13B se muestra un fenotipo de linfocitos T CD8⁺ humanos en sangre e hígado de ratones SRG y SRG-15 (ratón 1), con un aumento en las células hCD62L⁻ en ratones SRG-15 (ratón 1) en relación con ratones SRG tanto para sangre como para hígado. En las figuras 14A y 14B se proporcionan datos adicionales que caracterizan los linfocitos T de los ratones SRG-15 (ratón 1) en relación con los ratones SRG, que muestran la expresión del marcador CD69 residente en tejido en los linfocitos T CD8⁺ de pulmón (14A) e hígado (14B) de ratones SRG y SRG-15. Los datos anteriores proporcionan evidencia de un aumento en los linfocitos T residentes en tejido efectores en ratones SRG-15.

Para el ratón 2, la frecuencia de linfocitos T hCD3⁺ en el bazo, pulmón e hígado en relación con ratones SRG se evaluó 16 semanas después del injerto, como se muestra en las figuras 15A y 15B.

Ejemplo 4: Desarrollo de linfocitos residentes en tejidos humanos en ratones SRG-15

Debido a que se ha demostrado que la IL-15 la producen células epiteliales en el intestino y el pulmón y que puede desempeñar un papel importante para el desarrollo y la supervivencia de los linfocitos T y las células NK residentes en tejidos humanos, se analizaron linfocitos T y células NK residentes en tejido humanos en ratones SRG y SRG-15.

Materiales y métodos

Los ratones recién nacidos se irradian subletalmente sin anestesia 3 a 5 días después del nacimiento con 160 cGy y se devuelven a sus madres para que descansen. 4 a 12 horas después de la irradiación, estos neonatos se les trasplantan huHSC CD34⁺ en 25 μ l de PBS por vía intrahepática (i.h.) utilizando una aguja de 30G.

Resultados

Como se muestra en la figura 17A, el aislamiento de la población de linfocitos intraepiteliales del intestino delgado durante condiciones de estado estacionario en el ratón 1 reveló una mayor frecuencia de células CD45⁺ humanas en ratones SRG-15 en comparación con ratones SRG. Como se ilustra en la figura 17B, un análisis inmunohistoquímico demostró que las células NL CD45⁺ humanas se localizaron en la capa de células epiteliales del intestino delgado de ratones SRG-15 (ratón 1) (como indican las flechas en la figura 17B), mientras que se encontraron muy pocos linfocitos intraepiteliales en ratones SRG. Los LIE CD8⁺ humanos en ratones SRG-15 mostraron una expresión elevada de CD69, el marcador típico de los linfocitos T residentes en tejidos. En contraste con los LIE humanos (Sathaliyawala T, Kubota M, Yudanin N *et al.* Immunity 2013; 38:187-197), solo una subpoblación de LIE CD8⁺ humanos en los ratones SRG-15 expresaron el marcador CD103 residente en tejido (Figura 17C). Como se muestra en las figuras 16A y 16B,

el fenotipo del aumento de LIE CD8⁺ humanos en ratones SRG-15 (ratón 1) fue específico ya que hubo poca diferencia en el número de células de la lámina propia en el colon durante el estado estacionario entre ratones SRG y SRG-15. Además del aumento del número de linfocitos T humanos en el pulmón del ratón 1 SRG-15, como se muestra en la figura 13A, también se encontró mayor expresión de CD69 en linfocitos T CD8⁺ humanos en el pulmón de ratones SRG-15 en comparación con ratones SRG como se muestra en la figura 14A. Además, en la figura 14B se muestra un nivel más elevado de linfocitos T CD8⁺ que expresan hCD69 en el hígado del ratón 1 SRG-15 en comparación con el ratón SRG.

Similar al ratón 1 SRG-15 injertado, en el ratón 2 SRG-15 injertado, el análisis FACS reveló una mayor proporción de células CD45⁺ humanas en la fracción de LIE de ratones SRG-15 en comparación con ratones SRG (Figura 18A). Además, mientras que el número de LLP no cambió significativamente entre los ratones SRG y SRG-15 (ratón 2), se observó un aumento significativo en los LIE en los ratones SRG-15 (ratón 2) en relación con los ratones SRG (Figura 18B). La composición de las células hCD3⁺ en el intestino delgado de ratones SRG-15 (ratón 2) se proporciona en la figura 18C y muestra una mayor proporción de hCD8⁺ en relación con las células hCD4⁺. En la figura 18D se proporcionan las características fenotípicas de los linfocitos T hCD3⁺ hCD8⁺ en el bazo y el intestino delgado de ratones SRG-15 (ratón 2). Como se ilustra en la figura 18E, un análisis inmunohistoquímico demostró que los LIE CD8⁺ humanos se localizaron en la capa de células epiteliales del intestino delgado de ratones SRG-15 (ratón 2) (como indican las flechas en la figura 18E), mientras que se encontraron muy pocos linfocitos intraepiteliales en ratones SRG.

Como se indicó anteriormente en relación con las figuras 18A y 18B, en el ratón 2 SRG-15 injertado, se observó una mayor reconstitución de linfocitos intraepiteliales (LIE) humanos residentes en tejido linfoide asociado al intestino (GALT, del inglés *gut-associated lymphoid tissue*) en comparación con los ratones SRG (figuras 19A y 19C). De manera interesante, la mayoría de los linfocitos humanos observados eran células NK humanas. Como se esperaba para la fisiología humana normal del GALT, la mayoría de las células NK en el ratón 2 SRG-15 tanto en la sangre como en el bazo eran células NK citotóxicas (CD16⁺), mientras que en los LIE había una distribución comparable de células NK CD16⁺ frente a CD16⁻ (Figura 19B). No hubo cambios en el número de linfocitos de la lámina propia entre los ratones SRG y SRG-15 injertados (Figura 19C). A diferencia del ratón 1 SRG-15 injertado, en el ratón 2 SRG-15 injertado, una mayor proporción de LIE CD3⁺ CD8⁺ humanos expresó el marcador CD103 humano. Las placas de Peyer estaban completamente ausentes en los ratones SRG pero estaban presentes en el ratón 2 SRG-15 y estaban pobladas con linfocitos humanos como se muestra en las figuras 20A y 20B.

Ejemplo 5: Determinación del papel funcional de los linfocitos T residentes en tejidos humanos en ratones SRG-15 durante infecciones víricas

Para probar si los linfocitos T residentes en tejidos en ratones SRG-15 tienen una relevancia funcional durante la homeostasis, se determinó si el aumento del número de LIE CD8⁺ humanos en ratones SRG-15 inducía cambios característicos en la composición de la microbiota intestinal del ratón.

Materiales y métodos

Los ratones recién nacidos se irradian subletalmente sin anestesia 3 a 5 días después del nacimiento con 160 cGy y se devuelven a sus madres para que descansen. 4 a 12 horas después de la irradiación, estos neonatos se les trasplantan huHSC CD34⁺ en 25 µl de PBS por vía intrahepática (i.h.) utilizando una aguja de 30G.

Cuatro semanas después del injerto, los ratones SRG-15 se alojaron juntos durante cuatro semanas con ratones Balb/c SRG y donantes para igualar la microbiota intestinal entre las diferentes cepas. A continuación, los ratones se separaron y las muestras fecales se recogieron y analizaron mediante secuenciación de ARNr 16S. En la figura 21A se proporciona un cronograma para la convivencia y la recogida de muestras de heces para la secuenciación de la microbiota intestinal.

Resultados

Como se ilustra en 21B, para ratón 1, los resultados muestran que no hubo cambios significativos entre los ratones SRG-15 y SRG injertados después de la convivencia, lo que indica que los LIE CD8⁺ humanos en desarrollo no inducen cambios importantes durante las condiciones de estado estacionario. Se realizaron experimentos adicionales para determinar si los LIE CD8⁺, que son suficientes para eliminar la infección aguda por rotavirus, pueden eliminar la infección por rotavirus en ratones SRG-15 injertados. Tal como se muestra en la figura 22, los resultados indicaron que la infección aguda por rotavirus se puede eliminar en ratones SRG-15 injertados pero no en ratones SRG no injertados.

Ejemplo 6: Análisis de subconjuntos de células NK en ratones SRG-15 (ratón 2) y seres humanos

Los subconjuntos de células NK en ratones SRG-15 (ratón 2) se caracterizaron por varios marcadores fenotípicos y se compararon con seres humanos.

Materiales y métodos

Los subconjuntos de células NK se detectaron mediante citometría por tiempo de vuelo (CyTOF), como se describe en general en Yao *et al.* J. of Immunological Methods 415 (2014) 1-5, y analizado mediante ViSNE (el-AD *et al.* Nat. Biotechnol. junio de 2013; 31(6):545-52doi: 10.1038/nbt.2594. Epub 19 de mayo de 2013).

Resultados

En la figura 23A se proporcionan diagramas ViSNE que muestran análisis basados en CyTOF de 33 parámetros de subconjuntos de células NK CD56^{brillante} CD16⁻ y CD56^{oscuro} CD16⁺ en seres humanos (n = 20) y ratones SRG-15 (ratón 2) (n = 9). Cada punto representa una sola célula.

En la figura 23B se proporcionan diagramas ViSNE que muestran la intensidad de expresión de ocho marcadores seleccionados en células NK CD56^{brillante} CD16⁻ en seres humanos (n = 20) y ratones SRG-15 (ratón 2) (n = 9).

En los diagramas ViSNE de la figura 23C se muestra la intensidad de expresión de ocho marcadores seleccionados en células NK CD56^{oscuro} CD16⁺ en seres humanos (n = 20) y ratones SRG-15 (n = 9). Este análisis unicelular multidimensional de 33 moléculas clave de células NK humanas indica que las células NK humanas que se desarrollan en ratones SRG-15 son muy comparables a las células NK humanas en individuos sanos.

Ejemplo 7: Capacidad citotóxica de las células NK de ratones SRG-15

Materiales y métodos

Para estudios *in vitro* de citotoxicidad de NK, se trataron células NK esplénicas aisladas de ratones SRG y SRG-15 injertados con HSC humana (ratón 2) durante la noche con IL-2 humana. Al día siguiente, las células NK se cultivaron con células diana K562 marcadas con CFSE susceptibles a NK en proporciones variables de efector a diana (E:D). Después del cultivo junto con Shr, la destrucción de las células K562 se midió mediante análisis FACS de la captación de colorante de viabilidad Topro3 por células K562 (controlado en células CFSE+ para distinguir K562 y después análisis de porcentaje positivo para Topro3).

Además, para estudios *in vitro* de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), se trataron células NK esplénicas aisladas de ratones SRG y SRG-15 injertados con HSC humana durante la noche con IL-2 humana. Al día siguiente, las células NK se cultivaron con células Raji diana marcadas con CFSE en proporciones variables de efector a diana (E:D). Las células Raji se trataron previamente con anti-CD20 (Rituximab) o IgG de control. Después del cultivo junto con Shr, la destrucción de las células Raji se midió mediante análisis FACS de la captación de colorante de viabilidad Topro3 por células Raji (controlado en células CFSE+ y después análisis de porcentaje positivo para Topro3).

Para estudios *in vivo* de activación de células NK, a ratones SRG y SRG-15 injertados con HSC humana (ratón 2) se les inyectaron por vía intraperitoneal 50 µg de poli IC. Los ratones se sangraron previamente (antes de la inyección de poli IC) y 18 horas después de la inyección de poli IC. Se analizó CD45+ NKp46+ humana (células NK) para determinar la expresión del marcador de activación CD69 mediante FACS antes y después de la administración de poli IC.

Resultados

En un estudio clásico de citotoxicidad de NK, las células K562 deficientes en HLA de clase I diana NK clásica se sometieron a destrucción mediante células NK activadas de ratones SRG o SRG-15 (ratón 2). Como se muestra en la figura 24C (izquierda), las células NK esplénicas de ratones SRG y SRG-15 mostraron una capacidad citolítica comparable en relación con las células K562 cuando se normalizó el número.

Las células NK suelen ser responsables de la ADCC mediada por anticuerpos anti-CD20 contra las leucemias y linfomas de linfocitos B (véase, por ejemplo, J. Golay *et al.* Haematologica 2003; 88:1002-12). Con el fin de demostrar la capacidad de las células NK de ratones SRG-15 injertados para facilitar la ADCC mediada por anti-CD20, se probaron células NK esplénicas de ratones SRG y SRG-15 y se demostró que presentaban actividad de toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) comparable frente a células Raji tratadas con anti-CD20 cuando se normalizó el número de células (Figura 24C (derecha)).

Tal como se representa, por ejemplo, en las figuras 8 y 9, hay un aumento significativo de las células NK tanto en el bazo como en la sangre de los animales SRG-15. La capacidad de activación de las células NK en ratones SRG-15 se probó mediante la medición de la activación del marcador CD69 después de una inyección de poli-IC. Como se muestra en la figura 24A, el porcentaje de células NK positivas para el marcador de activación CD69 aumentó en los ratones SRG-15 en relación con los ratones SRG. Como se demostró que las células NK SRG-15 median la ADCC comparable a las células NK SRG *in vitro* en condiciones normalizadas, la capacidad de las células NK SRG-15 para presentar un mayor fenotipo activado *in vivo*, así como un mayor número de células NK en ratones SRG-15, sugiere que los ratones SRG-15 pueden ser un modelo *in vivo* adecuado para estudiar la ADCC de células NK humanas.

Ejemplo 8: Producción de IFN γ a partir de células NK procedentes de SRG y SRG-15**Materiales y métodos**

Las células NK se aislaron de esplenocitos agrupados de ratones SRG o SRG-15 (3 bazos por grupo) y las células NK se aislaron utilizando el kit de enriquecimiento EasySep Human NK (StemCell Technologies; n.º de cat 19055).

Las células NK también se aislaron de PBMC humanas sanas. Las células NK se trataron durante la noche con 10 ng/ml de IL-2 humana. Al día siguiente, las células se estimularon durante la noche con 10 ng/ml de IL-12p70 humana o 2 mg/ml de poli I:C o se dejaron sin tratar. Al día siguiente, se recogió el sobrenadante y se evaluaron los niveles de IFN γ utilizando el kit ELISA Quantikine de IFN γ humano (R&D systems; n.º de cat. DIF50). La pureza de las células NK se analizó mediante FACS y los niveles de IFN γ se normalizaron como picogramos (pg) producidos por células NK individuales. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA.

Resultados

Como se muestra en la figura 24B, las células NK procedentes de SRG y SRG-15 tienen una secreción de IFN γ comparable, pero menor que la de las células NK procedentes de PBMC humanas tras el tratamiento con IL-12p70.

Ejemplo 9: Las células NK humanas inhiben el crecimiento tumoral en ratones SRG-15

Se probó la capacidad de las células NK humanas para infiltrarse en xenoinjertos de tumores humanos e inhibir el crecimiento tumoral en ratones SRG-15 (ratón 2).

Materiales y métodos

Se inyectó i.p. Rituximab cada dos días (comenzado en el día 14 después de la inyección s.c. de 5 millones de células Raji). El crecimiento del tumor se evaluó mediante la medición del calibre y el volumen se calculó utilizando la siguiente fórmula: volumen tumoral = $0,5 \times (\text{largo} \times \text{ancho}^2)$. Se agruparon los datos de 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de la U de Mann-Whitney bilateral para datos independientes que compara ratones SRG-15 injertados y no tratados con ratones SRG-15 injertados y tratados con RTX (* $P < 0,05$).

El tumor s.c. se trituró y se digirió usando collagenasa D (1 hora, 37 °C). Las células recuperadas, incluidas las células tumorales e inmunitarias, se analizaron mediante un citómetro de flujo LSR II.

Resultados

Como se muestra en la figura 25A, las células NK humanas en ratones SRG-15 inhiben el crecimiento tumoral después del tratamiento con rituximab (RTX). En la figura 25B se muestra la frecuencia de células NK y linfocitos T humanos en xenoinjertos de tumores humanos de ratones SRG-15 no tratados ($n = 5$) y tratados con RTX ($n = 1$). En la figura 25C se muestran subconjuntos de células NK humanas en la sangre y el tumor de ratones SRG-15 no tratados ($n = 2$) y tratados con RTX ($n = 1$).

Ejemplo 10: Materiales y métodos adicionales utilizados en relación con los ejemplos anteriores

Aislamiento e inyección de células CD34⁺ humanas. El aislamiento y la inyección de células CD34⁺ humanas se realizó de acuerdo con los métodos descritos, por ejemplo, en Rongvaux A., Willinger T., Martinek J. *et al.* Nat Biotechnol 2014; 32:364-372.

Análisis de citometría de flujo de poblaciones de células humanas. El análisis de citometría de flujo de poblaciones de células humanas se realizó como se describe en Strowig T., Rongvaux A., Rathinam C. *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108:13218-13223, y en Rongvaux A., Willinger T., Martinek J. *et al.* Nat Biotechnol 2014; 32:364-372.

Histología. El tejido se fijó durante la noche en paraformaldehído al 4 %, se transfectó a etanol al 70 % y se incluyó en parafina.

RT-PCR cuantitativa. La RT-PCR cuantitativa se realizó como se describe en Rongvaux A., Willinger T., Martinek J. *et al.* Nat Biotechnol 2014; 32:364-372.

Secuenciación de ARNr 16S. La secuenciación de ARNr 16S se realizó como se describe en Palm N. W., de Zoete M. R., Cullen T.W. *et al.* Cell 2014; 158:1000-1010.

Infecciones víricas. Se obtuvieron rotavirus y virus de la influenza y se aplicaron en los métodos en cuestión.

Análisis estadístico. La significación estadística se realizó con el programa informático Prism 6 (GraphPad),

utilizando la prueba *t* de Student bilateral para datos independientes.

Los **anticuerpos FACS** se obtuvieron de BD Biosciences y BioLegend.

- 5 Lo anterior simplemente ilustra los principios de la invención. Se apreciará que los expertos en la materia podrán diseñar diversas disposiciones que, aunque no se describen explícitamente o se muestran en el presente documento, encarnan los principios de la invención. Asimismo, todos los ejemplos y el lenguaje condicional citados en el presente documento pretenden principalmente servir de ayuda al lector en la comprensión de los principios de la invención y los conceptos aportados por los inventores para fomentar la materia, y deben interpretarse sin limitación a dichos ejemplos y condiciones específicamente citados. Por otra parte, todas las afirmaciones contenidas en el presente documento sobre principios, aspectos y realizaciones de la invención, así como ejemplos específicos de la misma, pretenden abarcar los equivalentes tanto estructurales como funcionales de la misma. Además, se pretende que dichos equivalentes incluyan tanto los equivalentes actualmente conocidos como los equivalentes desarrollados en el futuro, es decir, cualquier elemento desarrollado que realice la misma función, independientemente de la estructura.
- 10 El alcance de la presente invención, por lo tanto, no pretende limitarse a las realizaciones ilustrativas mostradas y descritas en el presente documento. En su lugar, el alcance de la presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.
- 15

INFORMACIÓN ADICIONAL DE SECUENCIAS

20

LOCUS NM_001040022 ARNm de 4201 pb lineal PRI 15-MAR-2015
 DEFINICIÓN Proteína reguladora de señales alfa (SIRPA) de *Homo sapiens*, variante 1 de transcrito, ARNm.
 REGISTRO NM_001040022
 VERSIÓN NM_001040022.1 GI:91105763
 FUENTE *Homo sapiens* (Ser humano)

[SEQ ID NO: 11]

```

1   tccggcccgcc acccaccccc aagagggggcc ttcagctttg gggctcagag
   gcacgacctc

61   ctggggaggg ttaaaaggca gacgcccccc cggcccccgcc gcccccgccg
   cccgactcct

121  tcgcccgcctc cagcctctcg ccagtgggaa gcggggagca gccgcgcggc
   cggagtccgg

181  aggcgagggg aggtcggccg caacttcccc ggtccacctt aagaggacga
   ttagccagc

241  tcgcagcgct gaccttagaa aaacaagttt gcgcaaagtg gagcggggac
   ccggcctctg

301  ggcagccccc gcggcgcttc cagtgccttc cagccctcgc gggcggcgca
   gccgcggccc

361  atggagcccg ccggccccgc ccccgccgcg ctggggccgc tgctctgcct
   gctgctcgcc

```

ES 2 950 399 T3

421 gcgtcctgcg cctggtcagg agtggcgggt gaggaggagc tgcaggtgat
tcagcctgac

481 aagtcctgtg tggttgcagc tggagagaca gccactctgc gctgcactgc
gacctctctg

541 atccctgtgg ggcccatcca gtggttcaga ggagctggac caggccggga
attaatctac

601 aatcaaaaag aaggccactt cccccgggta acaactgttt cagacctcac
aaagagaaaac

661 aacatggact tttccatccg catcggtaac atcaccccag cagatgccgg
cacctactac

721 tgtgtgaagt tccggaaaagg gagccccgat gacgtggagt ttaagtctgg
agcaggcact

781 gagctgtctg tgcgcgccaa accctctgcc cccgtggat cgggccctgc
ggcgagggcc

841 acacctcagc acacagtgag cttcacctgc gagtcccacg gcttctcacc
cagagacatc

901 accctgaaat ggttcaaaaa tgggaatgag ctctcagact tccagaccaa
cgtggacccc

961 gtaggagaga gcgtgtccta cagcatccac agcacagcca aggtggtgct
gacccgcgag

1021 gacgttcact ctcaagtcac ctgcgagggtg gccacgtca ccttgacagg
ggaccctctt

1081 cgtgggactg ccaacttgtc tgagaccatc cgagttccac ccaccttgga
ggttactcaa

1141 cagcccgta gggcagagaa ccaggtgaat gtcacctgcc aggtgaggaa
gttctacccc

1201 cagagactac agctgacctg gttggagaat ggaaacgtgt cccggacaga
aacggcctca

1261 accgttacag agaacaagga tggtaacctac aactggatga gctggctcct
ggtgaatgta

1321 tctgcccaca gggatgatgt gaagctcacc tgccagggtg agcatgacgg
gcagccagcg

1381 gtcagcaaaa gccatgacct gaaggtctca gccacccga aggagcaggg
ctcaaatacc

1441 gccgctgaga aactggatc taatgaacgg aacatctata ttgtggtggg
tgtggtgtgc

1501 accttgctgg tggccctact gatggcggcc ctctacctcg tccgaatcag
acagaagaaa

1561 gccagggtc caacttcttc tacaagggtg catgagcccg agaagaatgc
cagagaaata

ES 2 950 399 T3

1621 acacaggaca caaatgatat cacatatgca gacctgaacc tgcccaaggg
gaagaagcct

1681 gctccccagg ctgcggagcc caacaaccac acggagtatg ccagcattca
gaccagcccg

1741 cagcccgcggt cggaggacac cctcacctat gctgacctgg acatgggtcca
cctcaaccgg

1801 acccccaagc agccggcccc caagcctgag ccgtccttct cagagtacgc
cagcgtccag

1861 gtcccagagga agtgaatggg accgtggttt gctctagcac ccatctctac
gcgctttctt

1921 gtcccacagg gagccgccgt gatgagcaca gccaaaccag ttcccggagg
gctggggcgg

1981 tgcaggctct gggaccagg ggccagggtg gctcttctct cccaccct
ccttggtct

2041 ccagcacttc ctgggcagcc acggccccct ccccccacat tgccacatac
ctggaggctg

2101 acgttgccaa accagccagg gaaccaacct gggaagtggc cagaactgcc
tggggtccaa

2161 gaactcttgt gcctccgtcc atcaccatgt gggttttgaa gaccctcgac
tgctccccg

2221 atgtccgaa gcctgatctt ccagggtggg gaggagaaaa tcccacctcc
cctgacctcc

2281 accacctcca ccaccaccac caccaccacc accaccacta ccaccaccac
ccaactgggg

2341 ctagagtggg gaagatttcc ctttagatc aaactgcccc ttccatggaa
aagctgaaa

2401 aaaactctgg aaccatatac caggcttggg gaggttgctg ccaacagtcc
tggcctcccc

2461 catccctagg ctaaagagcc atgagtcctg gaggaggaga ggaccctcc
caaaggactg

2521 gagacaaaac cctctgcttc cttgggtccc tccaagactc cctggggccc
aactgtgttg

2581 ctccaccgg acccatctct cccttctaga cctgagcttg cccctccagc
tagcactaag

2641 caacatctcg ctgtggacgc ctgtaaatta ctgagaaatg tgaaacgtgc
aatcttgaaa

2701 ctgaggtggt agaaaacttg atctgtggtg ttttgtttg tttttttct
taaaacaaca

2761 gcaacgtgat cttggctgtc tgtcatgtgt tgaagtccat ggttgggtct
tgtgaagtct

ES 2 950 399 T3

2821 gaggtttaac agtttgttgt cctggaggga ttttcttaca gcgaagactt
gagttcctcc

2881 aagtcccaga accccaagaa tgggcaagaa ggatcaggtc agccactccc
tgagacaca

2941 gccttctggc tgggactgac ttggccatgt tctcagctga gccacgaggc
tgtagtgca

3001 gccttctgtg accccgctgt ggtaagtcca gcctgccag ggctgctgag
ggctgcctct

3061 tgacagtgc gtcttatcga gaccaatgc ctcaagtctgc tcatccgtaa
agtggggata

3121 gtgaagatga caccctccc caccacctct cataagcact ttaggaacac
acagaggga

3181 gggatagtgg ccctggccgt ctatcctacc ctttagtga ccgccccat
cccggcttcc

3241 tgagctgatc cttgaagaag aaatcttcca tttctgctct caaacctac
tgggatcaaa

3301 ctggaataaa ttgaagacag ccagggggat ggtgcagctg tgaagctcgg
gctgattccc

3361 cctctgtccc agaaggttgg ccagagggtg tgaccagtt accctttaac
ccccaccctt

3421 ccagtcgggt gtgaggcct gaccgggcc agggaagca gatgtcgaa
gcctattta

3481 ttcagtcttc actataactc ttagagttga gacgctaag ttcatgactc
ctggccttgg

3541 gatgcccaag ggatttctgg ctcaaggctgt aaaagtagct gagccatcct
gcccattcct

3601 ggaggtccta caggtgaaac tgcaggagct cagcatagac ccagctctct
gggggatggt

3661 cacctggtga tttcaatgat ggcattccagg aattagctga gccaacagac
catgtggaca

3721 gctttggcca gagtcccgt gtggcatctg ggagccacag tgaccagcc
acctggctca

3781 ggctagtcc aaattccaaa agattggctt gtaaaccctc gtctccctct
cttttacc

3841 gagacagcac atacgtgtgc acacgcatgc acacacacat tcagtatttt
aaaagaatgt

3901 tttcttggtg ccattttcat tttattttat tttttaattc ttggaggggg
aaataaggga

3961 ataagccaa ggaagatgta tagcttttagc tttagcctgg caacctggag
aatccacata

ES 2 950 399 T3

4021 ccttgtgtat tgaacccag gaaaaggaag aggtcgaacc aacctgcgg
aaggagcatg

4081 gtttcaggag tttatttta gactgctggg aaggaaacag gccccatttt
gtatatagtt

4141 gcaacttaaa ctttttggt tgcaaaatat ttttgaata aagatttctg
ggaataatg

4201 a

[SEQ ID NO: 12]

Translation = MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKSVL
VAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTRNNM
DFSIRIGNITPADAGTYCYVKFRKSGPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARA
TPQHTVSFTCESHGFSRDLTKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVLT
REDVHSQVICEVAHVTLQGDPLRG TANLSETIRVPPTLEV TQQPVRAENQVNVTCQVR
KFYPQRLQLTWLENGNVSR TETASTVTENKDGTYNWSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVE
HDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTAAENTGSNERNIYIVGVVCTLLVALLMAALY
LVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNAREITQDTNDITYADLNLPKGKPPAPQAAEPNNH
TEYASIQTSPQPA SEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVPRK

LOCUS	NM_001040023 ARNm de 4109 pb lineal PRI 15-MAR-2015
DEFINICIÓN	Proteína reguladora de señales alfa (SIRPA) de <i>Homo sapiens</i> , variante 2 de transcrito, ARNm.
REGISTRO	NM_001040023
VERSIÓN	NM_001040023.1 GI:91105766
FUENTE	<i>Homo sapiens</i> (Ser humano)

[SEQ ID NO: 13]

1 ctctctggcc gccctggct ttatttctcg cgcgcttggg gtctctccca
gtctccgtct

61 ctccatttct cctggggggc ggggaggggg ggtctccaaa aaccgcggcg
gcggcggcgg

121 ccgctccagg cgcccgttcc ggagtcgggg ggaggcccag ccgggagggg
ggaagggggg

181 gagccttagt catttccccg ctccagcctg ctccgcccg agcgcgcact
cacggccgct

241 ctccctcctc gctccgcagc cgcggcccat ggagcccgcc ggcccggccc
ccggccgct

301 cgggcccgtg ctctgcctgc tgctcgccgc gtcctgcgcc tggtcaggag
tggcggtga

ES 2 950 399 T3

361 ggaggagctg caggtgattc agcctgacaa gtccgtgttg gttgcagctg
gagagacagc

421 cactctgcgc tgcactgcga cctctctgat ccctgtgggg cccatccagt
ggttcagagg

481 agctggacca ggccgggaat taatctacaa tcaaaaagaa ggccacttcc
cccgggtaac

541 aactgtttca gacctcaca agagaaacaa catggacttt tccatccgca
tcgtaacat

601 caccacagca gatgccggca cctactactg tgtgaagtcc cggaaggga
gccccgatga

661 cgtggagttt aagtctggag caggcactga gctgtctgtg cgcgccaaac
cctctgcccc

721 cgtggtatcg ggccctgcgg cgagggccac acctcagcac acagtgaagt
tcacctgcga

781 gtcccacggc ttctcaccca gagacatcac cctgaaatgg ttcaaaaatg
ggaatgagct

841 ctgagacttc cagaccaacg tggaccccggt aggagagagc gtgtcctaca
gcatccacag

901 cacagccaag gtggtgctga cccgcgagga cgttcactct caagtcactt
gcgaggtggc

961 ccacgtcacc ttgcaggggg accctcttcg tgggactgcc aacttgtctg
agaccatccg

1021 agttccaccc accttgaggg ttactcaaca gcccgtgagg gcagagaacc
aggtgaatgt

1081 cacctgccag gtgaggaagt tctaccccca gagactacag ctgacctggt
tgagaaatgg

1141 aaacgtgtcc cggacagaaa cggcctcaac cgttacagag aacaaggatg
gtacctacaa

1201 ctggatgagc tggctcctgg tgaatgtatc tgcccacagg gatgatgtga
agctcacctg

1261 ccaggtggag catgacgggc agccagcggc cagcaaaagc catgacctga
aggtctcagc

1321 ccacccgaag gagcagggtc caaataccgc cgctgagAAC actggatcta
atgaacggaa

1381 catctatatt gtggtgggtg tgggtgtgcac cttgctggtg gccctactga
tgccggccct

1441 ctacctgctc cgaatcagac agaagaaagc ccagggtccc acttcttcta
caaggttgca

1501 tgagcccagc aagaatgcca gagaaataac acaggacaca aatgatatca
catatgcaga

ES 2 950 399 T3

1561 cctgaacctg cccaagggga agaagcctgc tccccaggct ggggagccca
acaaccacac

1621 ggagtatgcc agcattcaga ccagcccgca gcccgcgtcg gaggacaccc
tcacctatgc

1681 tgacctggac atgggtccacc tcaaccggac cccaagcag ccggccccc
agcctgagcc

1741 gtccttctca gactacgcca gcgtccaggt cccgaggaag tgaatgggac
cgtggtttgc

1801 tctagcacc atctctacgc gctttcttgt cccacagga gccgccgtga
tgagcacagc

1861 caaccagtt cccggagggc tggggcgggtg caggtctctg gaccagggg
ccagggtggc

1921 tcttctctcc ccacccctcc ttggtctctc agcaattcct gggcagccac
ggcccccctc

1981 cccacattg ccacatacct ggaggtgac gttgccaaac cagccagga
accaacctgg

2041 gaagtggcca gaactgcctg gggccaaga actcttgtgc ctccgtccat
caccatgtgg

2101 gttttgaaga ccctcgactg cctccccgat gctccgaagc ctgatcttcc
agggtgggga

2161 ggagaaaatc ccacctcccc tgacctccac cacctccacc accaccacca
ccaccaccac

2221 caccactacc accaccaccc aactggggct agagtgggga agatttcccc
tttagatcaa

2281 actgcccctt ccatggaaaa gctggaaaaa aactctggaa cccatatcca
ggcttggtga

2341 ggttgctgcc aacagtcctg gcctcccoca tccctaggct aaagagccat
gagtcctgga

2401 ggaggagagg acccctccca aaggactgga gacaaaacc tctgcttcct
tgggtccctc

2461 caagactccc tggggcccaa ctgtgttgct ccaccggac ccattctctc
cttctagacc

2521 tgagcttgcc cctccagcta gcactaagca acatctcgct gtggacgcct
gtaaattact

2581 gagaaatgtg aaacgtgcaa tcttgaaact gaggtgttag aaaacttgat
ctgtggtgtt

2641 ttgttttgtt tttttctta aaacaacagc aacgtgatct tggctgtctg
tcatgtgttg

2701 aagtccatgg ttgggtcttg tgaagtctga ggtttaacag tttgttgctc
tgaggggatt

ES 2 950 399 T3

2761 ttcttacagc gaagacttga gttcctccaa gtcccagaac cccaagaatg
ggcaagaagg

2821 atcaggtcag ccactccctg gagacacagc cttctggctg ggactgactt
ggccatgttc

2881 tcagctgagc cacgcggctg gtagtgcagc cttctgtgac cccgctgtgg
taagtccagc

2941 ctgcccaggg ctgctgaggg ctgcctcttg acagtgcagt cttatcgaga
cccaatgcct

3001 cagtctgtct atccgtaaag tggggatagt gaagatgaca cccctcccca
ccacctctca

3061 taagcacttt aggaacacac agagggtagg gatagtggcc ctggccgtct
atcctacccc

3121 tttagtgacc gccccatcc cggctttctg agctgaccc tgaagaagaa
atcttccatt

3181 tctgctctca aaccctactg ggatcaaact ggaataaatt gaagacagcc
agggggatgg

3241 tgcagctgtg aagctcgggc tgattccccc tctgtcccag aaggttggcc
agaggggtgtg

3301 acccagttac cctttaaccc ccacccttcc agtcgggtgt gagggcctga
ccgggccccag

3361 ggcaagcaga tgtcgcaagc cctatattatt cagtcttcac tataactctt
agagttgaga

3421 cgctaattgt catgactcct ggccttgga tgcccaaggg atttctggct
caggtgttaa

3481 aagtagctga gccatcctgc ccattcctgg aggtcctaca ggtgaaactg
caggagctca

3541 gcatagaccc agctctctgg gggatgggtca cctggtgatt tcaatgatgg
catccaggaa

3601 ttagctgagc caacagacca tgtggacagc tttggccaga gctcccgtgt
ggcatctggg

3661 agccacagtg acccagccac ctggctcagg ctagtccaa attccaaaag
attggcttgt

3721 aaaccttcgt ctccctctct tttaccaga gacagcacat acgtgtgcac
acgcatgcac

3781 acacacattc agtatatttaa aagaatgttt tcttggtgcc attttcattt
tattttattt

3841 tttaattctt ggagggggaa ataagggaat aaggccaagg aagatgtata
gcttttagctt

3901 tagcctggca acctggagaa tccacatacc ttgtgtattg aaccccagga
aaaggaagag

3961 gtcgaaccaa ccctgcggaa ggagcatggt ttcaggagtt tattttaaga
ctgctgggaa

4021 ggaaacaggc cccatcttgt atatagttgc aacttaaact ttttggttg
caaaatattt

4081 ttgtaataaa gatttctggg taataatga

[SEQ ID NO: 12]

Translation = MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKSVL
 VAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTRNNM
 DFSIRIGNITPADAGTYCYVKFRKSGPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARA
 TPQHTVSFTCESHGFSRDLTLKWFKNELSDFTQNVDPVGESVSYSIHSTAKVVL
 REDVHSQVICEVAHVTLQGDPLRG TANLSETIRVPPTLEVTTQFPVRAENQVNVTCQVR
 KFYPQRLQLTWLENGNVSRTEASTVTENKDGTYNWSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVE
 HDGQPAVSKSHDLKVSAPHPKEQGSNTAAENTGSNERNIYIVGVVCTLLVALLMAALY
 LVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNAREITQDTNDITYADLNLPKGKKPAPQAAEPNNH
 TEYASIQTSQPASEDTLTLYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVPRK

LOCUS	NM_080792 ARNm de 3868 pb lineal PRI 15-MAR-2015
DEFINICIÓN	Proteína reguladora de señales alfa (SIRPA) de <i>Homo sapiens</i> , variante 3 de transcrito, ARNm.
REGISTRO	NM_080792 NM_004648
VERSIÓN	NM_080792.2 GI:91105786
FUENTE	<i>Homo sapiens</i> (Ser humano)

[SEQ ID NO: 14]

1 cgctcgctcg cagagaagcc gcggcccatg gagcccgccg gcccgggccc
 cggccgcctc

61 gggccgctgc tctgcctgct gctcgccgag tcctgcgcct ggtcaggagt
 ggcgggtgag

121 gaggagctgc aggtgattca gcctgacaag tccgtgttgg ttgcagctgg
 agagacagcc

181 actctgcgct gcactgcgac ctctctgac cctgtggggc ccatccagt
 gttcagagga

241 gctggaccag gccgggaatt aatctacaat caaaaagaag gccacttccc
 ccgggtaaca

301 actgtttcag acctcacaaa gagaaacaac atggactttt ccatccgcat
 cggtaacatc

361 accccagcag atgccggcac ctactactgt gtgaagttcc ggaaaggag
 ccccgatgac

ES 2 950 399 T3

421 gtggagttta agtctggagc aggcactgag ctgtctgtgc gcgccaaacc
ctctgcccc

481 gtggtatcgg gccctgcggc gagggccaca cctcagcaca cagtgaagctt
cacctgcgag

541 tcccacggct tctcaccag agacatcacc ctgaaatggt tcaaaaatgg
gaatgagctc

601 tcagacttcc agaccaacgt ggaccccgta ggagagagcg tgtcctacag
catccacagc

661 acagccaagg tgggtctgac ccgcgaggac gttcactctc aagtcactctg
cgaggtggcc

721 cacgtcacct tgcaggggga ccctcttcgt gggactgcc aattgtctga
gaccatccga

781 gttccaccca ccttgagggt tactcaacag cccgtgaggg cagagaacca
ggtgaatgtc

841 acctgccagg tgaggaagtt ctacccccag agactacagc tgacctggtt
ggagaatgga

901 aacgtgtccc ggacagaaac ggcctcaacc gttacagaga acaaggatgg
tacctacaac

961 tggatgagct ggctcctggt gaatgtatct gccacaggg atgatgtgaa
gtcacctgc

1021 caggtggagc atgacgggca gccagcggtc agcaaaagcc atgacctgaa
ggtctcagcc

1081 caccogaagg agcagggtc aaataccgcc gctgagaaca ctggatctaa
tgaacggaac

1141 atctatatgtg tgggtgggtgt ggtgtgcacc ttgctggtgg ccctactgat
ggcgccctc

1201 tacctcgtcc gaatcagaca gaagaaagcc cagggtcca cttcttctac
aaggttgcat

1261 gagcccgaga agaattgccag agaaataaca caggacacaa atgatatcac
atatgcagac

1321 ctgaacctgc ccaaggggaa gaagcctgct cccaggtctg cggagcccaa
caaccacag

1381 gagtatgcca gcattcagac cagccgcag cccgcgtcgg aggacacct
cacctatgct

1441 gacctggaca tggccacct caaccggacc cccaagcagc cggccccaa
gcctgagccg

1501 tccttctcag agtacgccag cgtccaggtc ccgaggaagt gaatgggacc
gtggtttgct

1561 ctagcaccca tctctacgag ctttcttgct ccacaggag ccgccgtgat
gagcacagcc

ES 2 950 399 T3

1621 aaccagttc ccggagggct ggggcggtgc aggtcttggg acccaggggc
caggttggt

1681 cttctctccc caccctcct tggctctcca gcacttctg ggcagccacg
gccccctccc

1741 cccacattgc cacatacctg gaggtgacg ttgccaaacc agccagggaa
ccaacctggg

1801 aagtggccag aactgcctgg ggtccaagaa ctcttggtgc tccgtccatc
accatgtggg

1861 ttttgaagac cctcgactgc ctccccgatg ctccgaagcc tgatcttcca
gggtggggag

1921 gagaaaatcc cacctcccct gacctccacc acctccacca ccaccaccac
caccaccacc

1981 accactacca ccaccacca actggggcta gagtggggaa gatttcccct
ttagatcaaa

2041 ctgccccttc catggaaaag ctggaaaaaa actctggaac ccatatccag
gcttggtgag

2101 gttgctgcca acagtcctgg cctcccccat ccctaggcta aagagccatg
agtcttgag

2161 gaggagagga cccctcccaa aggactggag acaaaaccct ctgcttcctt
gggtccctcc

2221 aagactccct ggggcccaac tgtgttgctc caccggacc catctctccc
ttctagacct

2281 gagcttgccc ctccagctag cactaagcaa catctcgctg tggacgctg
taaattactg

2341 agaaatgtga aacgtgcaat cttgaaactg aggtgttaga aaacttgatc
tgtggtgttt

2401 tgttttgttt tttttcttaa aacaacagca acgtgatctt ggctgtctgt
catgtgttga

2461 agtccatggt tgggtcttgt gaagtctgag gttaacagt ttgtgtcct
ggagggattt

2521 tcttacagcg aagacttgag ttctccaag tcccagaacc ccaagaatgg
gcaagaagga

2581 tcaggtcagc cactccctgg agacacagcc ttctggctgg gactgacttg
gccatgttct

2641 cagctgagcc acgcggtgg tagtgagcc ttctgtgacc ccgtgtggg
aagtccagcc

2701 tgcccagggc tgctgagggc tgctcttga cagtgcagtc ttatcgagac
ccaatgcctc

2761 agtctgtcga tccgtaaagt ggggatagtg aagatgacac cctcccccac
cacctctcat

ES 2 950 399 T3

2821 aagcacttta ggaacacaca gagggtaggg atagtggccc tggccgtcta
tcctaccctt

2881 ttagtgaccg ccccatccc ggctttctga gctgatcctt gaagaagaaa
tcttccattt

2941 ctgctctcaa accctactgg gatcaaactg gaataaattg aagacagcca
gggggatggt

3001 gcagctgtga agctcgggct gattccccct ctgtcccaga aggttggcca
gaggggtgtga

3061 ccagttacc ctttaacccc cacccttcca gtcgggtgtg agggcctgac
cgggccagg

3121 gcaagcagat gtcgcaagcc ctatttatcc agtcttcact ataactctta
gagttgagac

3181 gctaattgtc atgactcctg gccttgggat gcccaaggga tttctggctc
aggctgtaaa

3241 agtagctgag ccatcctgcc cattcctgga ggtcctacag gtgaaactgc
aggagctcag

3301 catagaccca gctctctggg ggatggtcac ctggtgattt caatgatggc
atccaggaat

3361 tagctgagcc aacagaccat gtggacagct ttggccagag ctcccgtgtg
gcatctggga

3421 gccacagtga ccagccacc tggctcaggc tagttccaaa ttccaaaaga
ttggcttgta

3481 aaccttcgtc tccctctctt ttaccagag acagcacata cgtgtgcaca
cgcatgcaca

3541 cacacattca gtattttaaa agaattgttt cttggtgcca ttttcatttt
attttatttt

3601 ttaattcttg gagggggaaa taagggaata aggccaagga agatgtatag
ctttagcttt

3661 agcctggcaa cctggagaat ccacatacct tgtgtattga accccaggaa
aaggaagagg

3721 tcgaaccaac cctgcggaag gagcatggtt tcaggagttt attttaagac
tgctgggaag

3781 gaaacaggcc ccattttgta tatagttgca acttaaactt tttggcttgc
aaaatatttt

3841 tgtaataaag atttctgggt aataatga

[SEQ ID NO: 12]

Translation = MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKSVL
VAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTNRNM
DFSIRIGNITPADAGTYVCVKFRKSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARA

ES 2 950 399 T3

TPQHTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSVSIHSTAKVVL
 REDVHSQVICEVAHVTLQGDPLRGTTANLSETIRVPPTLEVTTQQPVRAENQVNVTCQVR
 KFYPQRLQLTWLENGNVSRTEASTVTENKDGTYNWSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVE
 HDGQPAVSKSHDLKVSAPHPKEQGSNTAAENTGSNERNIYIVGVVCTLLVALLMAALY
 LVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNAREITQDTNDITYADLNLKPKGKPPAPQAAEPNNH
 TEYASIQTSQPASEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVPRK

LOCUS	NM_007547 ARNm de 4031 pb lineal ROD 15-FEB-2015
DEFINICIÓN	Proteína reguladora de señales alfa (Sirpa) de <i>Mus musculus</i> , variante 1 de transcrito, ARNm.
REGISTRO	NM_007547 NM_011208
VERSIÓN	NM_007547.4 GI:597084939
FUENTE	<i>Mus musculus</i> (Ratón doméstico)

[SEQ ID NO: 15]

1 cggaaggtg cgggcgcgag gagggggcgc tcggccgggc cgcctcgcg
 ctggcctcgc

61 gacggctccg cacagcccgc actcgctctg cgagctgtcc ccgctcgcg
 ttgctctccg

121 atctccgtcc ccgctccctc tccctcttcc tctccccctc tttccttctc
 cctcgctatc

181 cgtcccccg cccccgtgcc tctggctctg cgctggctc cctcgggtcc
 gctccccctt

241 cccgcgggcc tggcccggcg tcacgctccc ggagtctccc cgctcggcgg
 cgtctcattg

301 tgggagggg tcagatcacc ccgccgggcg gtggcgctgg ggggcagcgg
 agggggagg

361 gccttagtcg ttgcggcgcg ccgccgccc gctgcccag cgcgtcacc
 gccgctctcc

421 ctcttgctc tgcagccgcg gcccatggag cccgcgggcc cggccccctgg
 ccgctagg

481 ccgctgctgc tctgctgct gctctccgcg tctgtttct gtacaggagc
 cacggggaag

541 gaactgaagg tgactcagcc tgagaaatca gtgtctgttg ctgctgggga
 ttcgaccgtt

601 ctgaactgca ctttgacctc cttgttgccg gtgggaccca ttaggtggta
 cagaggagta

661 gggccaagcc ggctgttgat ctacagtttc gcaggagaat acgttctcgc
 aattagaaat

ES 2 950 399 T3

721 gtttcagata ctactaagag aaacaatatg gactttttcca tccgtatcag
taatgtcacc

781 ccagcagatg ctggcatcta ctactgtgtg aagttccaga aaggatcatc
agagcctgac

841 acagaaatac aatctggagg gggaacagag gtctatgtac tcgccaaacc
ttctccaccg

901 gaggtatccg gcccagcaga caggggcata cctgaccaga aagtgaactt
cacctgcaag

961 tctcatggct tctctccccg gaatatcacc ctgaagtggg tcaaagatgg
gcaagaactc

1021 cacccttgg agaccaccgt gaaccctagt ggaaagaatg tctcctacaa
catctccagc

1081 acagtcaggg tggactaaa ctccatggat gttaattcta aggtcatctg
cgaggtagcc

1141 cacatcacct tggatagaag ccctcttcgt gggattgcta acctgtctaa
cttcatccga

1201 gtttcaccca ccgtgaaggc caccacacag tccccgacgt caatgaacca
ggtgaacctc

1261 acctgccggg ctgagagggt ctaccccgag gatctccagc tgatctgggt
ggagaatgga

1321 aacgtatcac ggaatgacac gcccaagaat ctacacaaaga acacggatgg
gacctataat

1381 tacacaagct tggtcctggg gaactcatct gctcatagag aggacgtggg
gttcacgtgc

1441 caggtgaagc acgaccaaca gccagcgatc acccgaaacc ataccgtgct
gggatttgcc

1501 cactcgagtg atcaagggag catgcaaacc ttccctgata ataatgctac
ccacaactgg

1561 aatgtcttca tcggtgtggg cgtggcgtgt gctttgctcg tagtcctgct
gatggctgct

1621 ctctacctcc tccggatcaa acagaagaaa gccaaagggg caacatcttc
cacacggttg

1681 cacgagcccg agaagaacgc cagggaaata acccagatcc aggacacaaa
tgacatcaac

1741 gacatcacat acgcagacct gaatctgccc aaagagaaga agcccgacc
ccgggccctt

1801 gagcctaaca accacacaga atatgcaagc attgagacag gcaaagtgcc
taggccagag

1861 gataccctca cctatgctga cctggacatg gtccacctca gccgggcaca
gccagcccc

ES 2 950 399 T3

1921 aagcctgagc catctttctc agagtatgct agtgtccagg tccagaggaa
gtgaatgggg

1981 ctgtgggtctg tactaggccc catccccaca agttttcttg tcctacatgg
agtggccatg

2041 acgaggacat ccagccagcc aatcctgtcc ccagaaggcc aggtggcacg
ggtcctagga

2101 ccaggggtaa ggggtggcctt tgtcttccct ccgtggctct tcaacacctc
ttgggcaccc

2161 acgtcccctt cttccggagg ctgggtgttg cagaaccaga gggcgaactg
gagaaagctg

2221 cctggaatcc aagaagtgtt gtgcctcggc ccatcactcg tgggtctgga
tcctggctct

2281 ggcaacccca ggttgcgctc ttgatgttcc agagcttggg cttctgtgtg
gagaagagct

2341 caccatctct acccaacttg agctttggga ccagactccc tttagatcaa
accgccccat

2401 ctgtggaaga actacaccag aagtcagcaa gttttcagcc aacagtgtg
gcctccccac

2461 ctcccaggct gactagccct ggggagaagg aaccctctcc tcctagacca
gcagagactc

2521 cctgggcatg ttcagtgtgg cccacctcc cttccagtcc cagcttgctt
cctccagcta

2581 gcactaactc agcagcatcg ctctgtggac gcctgtaaat tattgagaaa
tgtgaactgt

2641 gcagtcttaa agctaagggtg ttagaaaatt tgatttatgc tgtttagttg
ttgttggtt

2701 tcttttcttt ttaatttctt tttctttttt gatttttttt ctttccctta
aaacaacagc

2761 agcagcatct tggctctttg tcatgtgttg aatgggtggg tcttgtgaag
tctgaggtct

2821 aacagtttat tgtcctggaa ggattttctt acagcagaaa cagatttttt
tcaaattccc

2881 agaatcctga ggaccaagaa ggatccctca gctgctactt ccagcaccca
gcgtcactgg

2941 gacgaaccag gccctgttct tacaaggcca catggctggc ctttgcctc
catggctact

3001 gtggtaagtg cagccttgtc tgaccaatg ctgacctaat gttggccatt
ccacattgag

3061 gggacaaggc cagtgatgcc ccccttcaact cacaagcact tcagaggcat
gcagagagaa

ES 2 950 399 T3

3121 gggacactcg gccagctctc tgaghtaata agtgcaagga ggagtcggtt
ttttgccagc

3181 aaacctcagc aggatcacac tggaacagaa cctgggtcata cctgtgacaa
cacagctgtg

3241 agccagggca aaccacccac tgtcactggc tcgagagtct gggcagaggc
tctgaccctc

3301 caccctttaa actggatgcc ggggcctggc tgggccaat gccaaagtgg
tatggcaacc

3361 ctgactatct ggtcttaaca tgtagctcag gaagtggagg cgctaattgc
ccaatccct

3421 ggggattcct gattccagct attcatgtaa gcagagccaa cctgcctatt
tctgtagggtg

3481 cgactgggat gttaggagca cagcaaggac ccagctctgt agggctgggtg
acctgatact

3541 tctcataatg gcatctagaa gttaggctga gttggcctca ctggcccagc
aaaccagaac

3601 ttgtctttgt ccgggccatg ttcttgggct gtcttctaata tccaaaggg
tggttggtta

3661 agctccaccc ctttctcctc tgcctaaaga catcacatgt gtatacacac
acgggtgtat

3721 agatgagtta aaagaatgtc ctgctggca tcctaatttt gtcttaagtt
tttttgagg

3781 gagaaaggaa caaggcaagg gaagatgtgt agctttggct ttaaccaggc
agcctggggg

3841 ctccaagcc tatggaaccc tggtaaaaag aagagaacag aagcgccctg
tgaggagtgg

3901 gatttgtttt tctgtagacc agatgagaag gaaacaggcc ctgttttgta
catagttgca

3961 acttaaaatt tttggcttgc aaaatatatt tgtaataaag atttctgggt
aacaataaaa

4021 aaaaaaaaaa a

[SEQ ID NO: 16]

Translation = MEPAGPAPGRLGPIILLCLLLSASCFTGATGKELKVTQPEKSVS
VAAGDSTVLNCTLTSLLPVGPIRWYRGVPSRLLIYSFAGEYVPRIRNVSDTTKRNNM
DFSIRISNVTPADAGIYCVKFQKGSSEPDTEIQSGGGTEVYVLAKPSPPEVSGPADR
GIPDQKVNFTCKSHGFSPRNLTKWFKDQELHPLETTVNPSPGKNVSYNISSTVRVVL
NSMDVNSKVICEVAHITLDRSPLRGIANLSNFIRVSPTVKVTQQSPTSMNQVNLTCRA
ERFYPEDLQLIWLENGVSRNDTPKNLTKNTDGTYNYTSLFLVNSSAHREDVVFTCQV
KHDQQPAITRNHTVLGFAHSSDQSMQTFPDNNATHNWNVFIGVGVACALLVLLMAA
LYLLRIKQKKAKGSTSSTRLHEPEKNAREITQIQDTNDINDITYADLNLPEKKKPAPR
APEPNNHTEYASIEGTGVPRPEDTLTYADLDMVHLSRAQPAPKPEPSFSEYASVQVQR
K

LOCUS NM_001177647 ARNm de 3377 pb lineal ROD 15-FEB-2015
 DEFINICIÓN Proteína reguladora de señales alfa (Sirpa) de *Mus musculus*, variante 3 de transcrito, ARNm.
 REGISTRO NM_001177647
 VERSIÓN NM_001177647.2 GI:597436949
 FUENTE *Mus musculus* (Ratón doméstico)

[SEQ ID NO: 17]

```

1      cggaaggtg cgggcgcgag gagggggcgc tcggccgggc cgcctcgcg
ctggcctcgc

61     gacggctccg cacagcccgc actcgtcttg cgagctgtcc ccgctcgcgc
ttgctctccg

121    atctccgtcc ccgctccctc tccctcttcc tctccccctc tttccttctc
cctcgtatc

181    cgtcccccg cccccgtgcc tctggctctg cgcttggttc cctcgggtcc
gtccccctt

241    cccgccggcc tggcccggcg tcacgtctcc ggagtctccc cgctcggcgg
cgtctcattg

301    tgggaggggg tcagatcacc ccgccgggcg gtggcgctgg ggggcagcgg
agggggaggg

361    gccttagtcg ttgcgccgcg ccgccgccc gcctgccgag cgcgtcacc
gccgtctcc

421    ctcttgctc tgcagccgcg gcccatggag cccgccggcc cggcccctgg
ccgcctaggg

481    ccgtgctgc tctgctgct gctctccgcg tcctgtttct gtacaggagc
cacggggaag

541    gaactgaagg tgactcagcc tgagaaatca gtgtctgttg ctgctgggga
ttcgaccgtt

601    ctgaactgca ctttgacctc cttgttgccg gtgggaccca ttaggtggta
cagaggagta

661    gggccaagcc ggctgttgat ctacagtttc gcaggagaat acgttcctcg
aattagaaat

721    gtttcagata ctactaagag aaacaatatg gacttttcca tccgtatcag
taatgtcacc

781    ccagcagatg ctggcatcta ctactgtgtg aagttccaga aaggatcatc
agagcctgac
    
```

ES 2 950 399 T3

841 acagaaatac aatctggagg gggaacagag gtctatgtac tcgataataa
tgctacccac

901 aactggaatg tcttcatcgg tgtgggcgtg gcgtgtgctt tgctcgtagt
cctgctgatg

961 gctgctctct acctcctccg gatcaaacag aagaaagcca aggggtcaac
atcttcaca

1021 cggttgacag agcccgagaa gaacgccagg gaaataacct agatccagga
caciaatgac

1081 atcaacgaca tcacatacgc agacctgaat ctgccccaaag agaagaagcc
cgacccccg

1141 gcccctgagc ctaacaacca cacagaatat gcaagcattg agacaggcaa
agtgcctagg

1201 ccagaggata ccttcaccta tgctgacctg gacatgggtcc acctcagccg
ggcacagcca

1261 gcccccaagc ctgagccatc tttctcagag tatgctagtg tccaggtcca
gaggaagtga

1321 atggggctgt ggtctgtact aggccccatc cccacaagtt ttcttgcct
acatggagt

1381 gccatgacga ggacatccag ccagccaatc ctgtccccag aaggccaggt
ggcacgggtc

1441 ctaggaccag gggtaagggt ggcctttgtc ttccctccgt ggctcttcaa
cacctcttg

1501 gcaccacgt ccccttcttc cggaggctgg gtgttgacaga accagagggc
gaactggaga

1561 aagctgcctg gaatccaaga agtggtgtgc ctgggccat cactcgtggg
tctggatcct

1621 ggtcttgga acccaggtt gcgtccttga tgttcagag cttggtcttc
tgtgtggaga

1681 agagctcacc atctctaccc aacttgagct ttgggaccag actcccttta
gatcaaaccg

1741 ccccatctgt ggaagaacta caccagaagt cagcaagttt tcagccaaca
gtgctggcct

1801 cccacctcc caggctgact agccctgggg agaaggaacc ctctcctcct
agaccagcag

1861 agactccctg ggcattgtca gtgtggcccc acctcccttc cagtcccagc
ttgcttcctc

1921 cagctagcac taactcagca gcacgctct gtggacgcct gtaaattatt
gagaaatgtg

1981 aactgtgcag tcttaaagct aagggtgttag aaaatttgat ttatgctgtt
tagttgtgt

ES 2 950 399 T3

2041 tgggttttctt ttcttttttaa tttcttttttc ttttttgatt ttttttcttt
cccttaaaaac

2101 aacagcagca gcatcttggc tctttgtcat gtgttgaatg gttgggtctt
gtgaagtctg

2161 aggtctaaca gtttattgtc ctggaaggat tttcttacag cagaaacaga
tttttttcaa

2221 attcccagaa tcctgaggac caagaaggat ccctcagctg ctacttccag
caccagcgt

2281 cactgggacg aaccaggccc tgttcttaca aggccacatg gctggccctt
tgcctccatg

2341 gctactgtgg taagtgcagc cttgtctgac ccaatgctga cctaattgtg
gccattccac

2401 attgagggga caaggtcagt gatgcccccc ttcactcaca agcacttcag
aggcatgcag

2461 agagaaggga cactcggcca gctctctgag gtaatcagtg caaggaggag
tccgtttttt

2521 gccagcaaac ctcagcagga tcacactgga acagaacctg gtcataacctg
tgacaacaca

2581 gctgtgagcc agggcaaac acccactgtc actggctcga gagtctgggc
agaggctctg

2641 accctccacc ctttaaactg gatgccgggg cctggctggg cccaatgcca
agtggttatg

2701 gcaaccctga ctatctggtc ttaacatgta gctcaggaag tggaggcgct
aatgtcccca

2761 atccctgggg attcctgatt ccagctattc atgtaagcag agccaacctg
cctatttctg

2821 taggtgcgac tgggatgtta ggagcacagc aaggaccag ctctgtaggg
ctggtgacct

2881 gatacttctc ataatggcat ctagaagtta ggctgagttg gcctcactgg
cccagcaaac

2941 cagaacttgt ctttgtccgg gccatgttct tgggctgtct tctaattcca
aagggttggg

3001 tggtaaagct ccacccctt ctctctgcc taaagacatc acatgtgtat
acacacagg

3061 gtgtatagat gagttaaaag aatgtcctcg ctggcatcct aattttgtct
taagtttttt

3121 tggagggaga aaggaacaag gcaagggaag atgtgtagct ttggctttaa
ccaggcagcc

3181 tgggggctcc caagcctatg gaaccctggg acaaagaaga gaacagaagc
gccctgtgag

3241 gagtgggatt tgtttttctg tagaccagat gagaaggaaa caggccctgt
ttgtacata

3301 gttgcaactt aaaatttttg gcttgcaaaa tatttttgta ataaagattt
ctgggtaaca

3361 ataaaaaaaa aaaaaaa

[SEQ ID NO: 18]

Translation = MEPAGPAPGRLGPLLLCLLLSASCFCCTGATGKELKVTQPEKSVS
 VAAGDSTVLNCTLTSLLPVGPIRWYRGVPSRLLIYSFAGEYVPRI RNVS DTTKRNNM
 DFSIRISNVTPADAGIYYCVKFQKGSSEPDTEIQSGGGTEVYVLDNNATHNWNVFIGV
 GVACALLVVLMAALYLLRIKQKAKGSTSSTRLHEPEKNAREITQIQDTNDINDITY
 ADLNLPEKKPAPRAPEPNNHTEYAS IETGKVPRPEDTLTYADLDMVHLSRAQPAPKP
 EPSFSEYASVQVQRK

LOCUS NM_001291019 ARNm de 4043 pb lineal ROD 15-FEB-2015
 DEFINICIÓN Proteína reguladora de señales alfa (Sirpa) de *Mus musculus*, variante 4 de transcrito, ARNm.
 REGISTRO NM_001291019 XM_006498985
 VERSIÓN NM_001291019.1 GI:597436868
 FUENTE *Mus musculus* (Ratón doméstico)

[SEQ ID NO: 19]

1 cgggaaggtg cgggcgcgag gagggggcgcg tcggccgggc cgccctcgcg ctggcctcgc
 61 gaaggctccg cacagcccg cactcgctctg cgagctgtcc ccgctcgcg cgctctccg
 121 atctccgtcc ccgctccctc tccctcttcc tctccccctc tttccttctc cctcgctatc
 181 cgtccccccg cccccgtgcc tctggctctg cgcttggtcc cctcggggtcc gctccccctt
 241 cccgccggcc tggcccggcg tcacgctccc ggagtctccc cgctcggcgg cgtctcattg
 301 tgggaggggg tcagatcacc ccgccggcg gtggcgctgg ggggcagcgg agggggaggg
 361 gccttagtcg ttcgcccgcg ccgcccgccc gcctgccgag cgcgctcacc gccgctctcc
 421 ctcttgctc tgcagccgcg gcccatggag cccgccggcc cggccccctgg ccgcctaggg
 481 ccgctgctgc tctgcctgct gctctccgcg tcctgtttct gtacaggagc cacggggaag
 541 gaactgaagg tgactcagcc tgagaaatca gtgtctgttg ctgctgggga ttcgaccgtt
 601 ctgaactgca ctttgacctc cttgttgccg gtgggaccca ttaggtggta cagaggagta
 661 gggccaagcc ggctgttgat ctacagtttc gcaggagaat acgttcctcg aattagaaat
 721 gtttcagata ctactaagag aaacaatatg gacttttcca tccgtatcag taatgtcacc
 781 ccagcagatg ctggcatcta ctactgtgtg aagttccaga aaggatcatc agagcctgac

ES 2 950 399 T3

841 acagaaatac aatctggagg gggaacagag gtctatgtac tcgccaaacc ttctccaccg
901 gaggtatccg gccagcaga caggggcata cctgaccaga aagtgaactt cacctgcaag
961 tctcatggct tctctccccg gaatatcacc ctgaagtgg tcaaagatgg gcaagaactc
1021 cacccttg agaccaccgt gaaccctagt ggaaagaatg tctcctacaa
catctccagc
1081 acagtcaggg tggactaaa ctccatggat gttaattcta aggtcatctg
cgaggtagcc
1141 cacatcacct tggatagaag cctctctcgt gggattgcta acctgtctaa
cttcatccga
1201 gtttcacca cctgaaggc caccacacag tccccgacgt caatgaacca
ggtgaacctc
1261 acctgccggg ctgagagggt ctaccccgag gatctccagc tgatctggct
ggagaatgga
1321 aacgtatcac ggaatgacac gcccaagaat ctacaaaaga acacggatgg
gacctataat
1381 tacacaagct tgttctctgg gaactcatct gctcatagag aggacgtgg
gttcacgtgc
1441 caggtgaagc acgaccaaca gccagcgatc acccgaaacc ataccgtgct
gggatttgcc
1501 cactcgagtg atcaaggag catgcaaacc ttccctgata ataatgctac
ccacaactgg
1561 aatgtcttca tcggtgtggg cgtggcgtgt gctttgctcg tagtctgct
gatggctgct
1621 ctctacctc tccgatcaa acagaagaaa gccaggggt caacatcttc
cacacggtg
1681 cacgagcccg agaagaacgc cagggaaata acccaggtac agtctttgat
ccaggacaca
1741 aatgacatca acgacatcac atacgcagac ctgaatctgc ccaaagagaa
gaagcccgca
1801 ccccgggccc ctgagcctaa caaccacaca gaatatgcaa gcattgagac
aggcaaagtg
1861 cctaggccag aggataccct cacctatgct gacctggaca tggccacct
cagccgggca
1921 cagccagccc ccaagcctga gccatctttc tcagagtatg ctagtgtcca
ggtccagagg
1981 aagtgaatgg ggctgtggc tgtactaggc cccatcccca caagttttct
tgtctacat
2041 ggagtggcca tgacaggag atccagccag ccaatcctgt cccagaagg
ccaggtggca

ES 2 950 399 T3

2101 cgggtcctag gaccaggggt aagggtggcc tttgtcttcc ctccgtggct
cttcaacacc

2161 tcttgggcac ccacgtcccc ttcttccgga ggctgggtgt tgcagaacca
gaggcggaac

2221 tggagaaagc tgcttgaat ccaagaagtg ttgtgcctcg gccatcact
cgtgggtctg

2281 gatcctggtc ttggcaaccc caggttgctg ccttgatgtt ccagagcttg
gtcttctgtg

2341 tggagaagag ctacccatct ctacccaact tgagcttttg gaccagactc
cctttagatc

2401 aaaccgcccc atctgtggaa gaactacacc agaagtcagc aagttttcag
ccaacagtgc

2461 tggcctcccc acctcccagg ctgactagcc ctggggagaa ggaaccctct
ctcctagac

2521 cagcagagac tccctgggca tggtcagtgt ggccccacct cccttcagc
ccagcttg

2581 ttcctccagc tagcactaac tcagcagcat cgctctgttg acgctgtaa
attattgaga

2641 aatgtgaact gtgcagtctt aaagctaagg tgtagaaaa tttgatttat
gctgtttagt

2701 tggtgttggg tttcttttct ttttaatttc ttttctttt ttgattttt
ttctttccct

2761 taaaacaaca gcagcagcat cttggctctt tgtcatgtgt tgaatggttg
ggtcttgtga

2821 agtctgaggt ctaacagttt attgtcctgg aaggattttc ttacagcaga
aacagatttt

2881 tttcaaattc ccagaatcct gaggaccaag aaggatccct cagctgctac
ttccagcacc

2941 cagcgtcact gggacgaacc aggcctgtt cttacaaggc cacatggctg
gccctttgcc

3001 tccatggcta ctgtggtaag tgcagccttg tctgacccaa tgctgaccta
atgttggcca

3061 ttccacattg aggggacaag gtcagtgatg ccccccttca ctcaacagca
cttcagaggc

3121 atgcagagag aagggacact cggccagctc tctgaggtaa tcagtgaag
gaggagtccg

3181 ttttttgcca gcaaacctca gcaggatcac actggaacag aacctggtca
tacctgtgac

3241 aacacagctg tgagccaggg caaaccaccc actgtcactg gctcgagagt
ctgggcagag

ES 2 950 399 T3

3301 gctctgaccc tccacccttt aaactggatg ccggggcctg gctgggcca
atgccaagtg

3361 gttatggcaa ccctgactat ctggtcttaa catgtagctc aggaagtgga
ggcgctaagt

3421 tccccaatcc ctggggattc ctgattccag ctattcatgt aagcagagcc
aacctgccta

3481 tttctgtagg tgcgactggg atgttaggag cacagcaagg acccagctct
gtagggctgg

3541 tgacctgata cttctcataa tggcatctag aagttaggct gagtggcct
cactggcca

3601 gcaaaccaga acttgtcttt gtccgggcca tgttcttggg ctgtcttcta
attccaaagg

3661 gttggttgg aaagctccac ccccttctcc tctgcctaaa gacatcacat
gtgtatacac

3721 acacgggtgt atagatgagt taaaagaatg tcctcgctgg catcctaatt
ttgtcttaag

3781 tttttttgga gggagaaagg aacaaggcaa gggaagatgt gtagctttgg
ctttaaccag

3841 gcagcctggg ggctcccaag cctatggaac cctggtacaa agaagagaac
agaagcgccc

3901 tgtgaggagt gggatttgtt tttctgtaga ccagatgaga aggaaacagg
ccctgttttg

3961 tacatagttg caacttaaaa tttttggctt gcaaaatatt tttgtaataa
agatttctgg

4021 gtaacaataa aaaaaaaaaa aaa

[SEQ ID NO: 20]

Translation = MEPAGPAPGRLGPLLLCLLLSASCFCTGATGKELKVTQPEKSVS
VAAGDSTVLNCTLTSLLPVGPIRWYRGVGPSRLLIYSFAGEYVPRIRNVSDTTKRNNM
DFSIRISNVTPADAGIYYCVKFQKGSSEPDETIQSGGGTEVYVLAKPSPPEVSGPADR
GIPDQKVNFTCKSHGFSPRNITLKWFKDGQELHPLETTVNP SGKNVSYNISSTVRVVL
NSMDVNSKVICEVAHITLDRSPLRGIANLSNFIRVSPTVKVTQQSPTSMNQVNLTCRA
ERFYPEDLQLIWLENGNVSRNDTPKNLTKNTDGTYNYSLSFLVNSSAHREDVVFTCQV
KHDQQPAITRNHTVLGFAHSSDQGSMTFPDNNATHNWNVFIGVGACALLVLLMAA
LYLLRIKQKKAKGSTSSTRLHEPEKNAREITQVQSLIQDTNDINDITYADLNLPEKK
PAPRAPEPNNHTEYASIIETGKVPREPDTLTADLDMVHLSRAQPAPKPEPSFSEYASV
QVQRK

LOCUS 15-FEB-2015	NM_001291020 ARNm de 3845 pb lineal ROD
DEFINICIÓN	Proteína reguladora de señales alfa (Sirpa) de <i>Mus musculus</i> , variante 5 de transcrito, ARNm.
REGISTRO	NM_001291020 XM_006498984
VERSIÓN	NM_001291020.1 GI:597436945
PALABRAS CLAVE	RefSeq.
FUENTE	<i>Mus musculus</i> (Ratón doméstico)

[SEQ ID NO: 21]

```

1   aagctccctt gccgcgggca gcctcttgcc cactggagtc taaggactgg ccgggtgaga
61  ggccgagacc agggggcgat cggccgccac ttcccagtc caccttaaga ggaccaagta
121 gccagcccg cgcgccgacc tcagaaaaac aagtttgcc aaagtgggtgc gcggccagcc
181 tctgggcaga gggagcgggtg cttccaccgc ctggcagccc tgcgcgcggc ggcgcagccg
241 cggcccatgg agcccgcggg cccggcccct ggcgcctag ggcgcgtgct gctctgcctg
301 ctgctctccg cgtcctgttt ctgtacagga gccacgggga aggaactgaa ggtgactcag
361 cctgagaaat cagtgtctgt tgctgctggg gattcgaccg ttctgaactg cactttgacc
421 tccttggtgc cggtagggacc cattaggtgg tacagaggag tagggccaag ccggtgtgtg
481 atctacagtt tcgcaggaga atacgttcct cgaattagaa atgtttcaga tactactaag
541 agaaacaata tggacttttc catccgtatc agtaatgtca cccagcaga tgctggcatc
601 tactactgtg tgaagttcca gaaaggatca tcagagcctg acacagaaat acaatctgga
661 gggggaacag aggtctatgt actcgccaaa cttctccac cggaggatc cggccagca
721 gacaggggca tacctgacca gaaagtgaac ttcacctgca agtctcatgg cttctctccc
781 cggaatatca cctgaagtg gttcaaagat gggcaagaac tccaccctt ggagaccacc
841 gtgaacccta gtggaaagaa tgtctcctac aacatctcca gcacagtcag ggtggtacta
901 aactccatgg atgttaattc taaggatcat tgcgaggtag cccacatcac cttggataga
961 agccctcttc gtgggattgc taacctgtct aacttcatcc gagtttcacc caccgtgaag
1021 gtcacccaac agtccccgac gtcaatgaac caggatgaac tcacctgccg
    ggctgagagg
1081 ttctaccccg aggatctcca gctgatctgg ctggagaatg gaaacgtatc
    acggaatgac
1141 acgccaaga atctcacaaa gaacacggat gggacctata attacacaag
    cttgttcctg
1201 gtgaactcat ctgctcatag agaggacgtg gtgttcacgt gccaggtgaa
    gcacgaccaa
1261 cagccagcga tcaccgaaa ccataccgtg ctgggatttg cccactcgag
    tgatcaaggg

```

ES 2 950 399 T3

1321 agcatgcaaa ccttcctga taataatgct acccacaact ggaatgtctt
catcggtgtg

1381 ggcgtggcgt gtgctttgct cgtagtcctg ctgatggctg ctctctacct
cctccggtac

1441 aacagaaga aagccaagggt gtcaacatct tccacacggt tgcacgagcc
cgagaagaac

1501 gccagggaaa taaccaggt acagtctttg atccaggaca caaatgacat
caacgacatc

1561 acatacgag acctgaatct gcccaaagag aagaagcccg cccccgggc
ccctgagcct

1621 aacaaccaca cagaatatgc aagcattgag acaggcaaag tgcctaggcc
agaggatacc

1681 ctacacctatg ctgacctgga catggtccac ctacagccggg cacagccagc
ccccagcct

1741 gagccatctt tctcagagta tgctagtgtc cagggtccaga ggaagtgaat
ggggctgtgg

1801 tctgtactag gcccatccc cacaagtttt cttgtcctac atggagtggc
catgacgagg

1861 acatccagcc agccaatcct gtccccagaa ggccaggtgg cacgggtcct
aggaccagg

1921 gtaagggtgg cctttgtctt ccctccgtgg ctcttcaaca cctcttgggc
accacgtcc

1981 ccttcttccg gaggctgggt gttgcagaac cagagggcga actggagaaa
gctgcctgga

2041 atccaagaag tgttgtgcct cggcccatca ctctgtgggtc tggatcctgg
tcttggaac

2101 ccaggttgc gtccttgatg ttccagagct tggctctctg tgtggagaag
agctcaccat

2161 ctctacccaa cttgagcttt gggaccagac tccctttaga tcaaaccgcc
ccatctgtgg

2221 aagaactaca ccagaagtca gcaagttttc agccaacagt gctggcctcc
ccacctcca

2281 ggctgactag ccctggggag aaggaaccct ctctcctag accagcagag
actccctggg

2341 catgttcagt gtggccccac ctcccttcca gtcccagctt gcttctcca
gctagcacta

2401 actcagcagc atcgctctgt ggacgcctgt aaattattga gaaatgtgaa
ctgtgcagtc

2461 ttaaagctaa ggtgttagaa aatttgattt atgctgttta gttgtgttg
ggtttctttt

ES 2 950 399 T3

2521 cttttttaatt tctttttctt ttttgatatt ttttctttcc cttaaaacaa
cagcagcagc

2581 atcttggtc tttgtcatgt gttgaatggt tgggtcttgt gaagtctgag
gtctaacagt

2641 ttattgtcct ggaaggattt tcttacagca gaaacagatt tttttcaa
tcccagaatc

2701 ctgaggacca agaaggatcc ctgagctgct acttccagca cccagcgtca
ctgggacgaa

2761 ccaggccctg ttcttacaag gccacatggc tggccctttg cctccatggc
tactgtggtg

2821 agtgcagcct tgtctgacct aatgctgacc taatgttggc cattccacat
tgaggggaca

2881 aggtcagtga tgccccctt cactcacaag cacttcagag gcatgcagag
agaagggaca

2941 ctcgccagc tctctgaggt aatcagtgcaggaggagtc cgttttttgc
cagcaaact

3001 cagcaggatc aactggaac agaactggt catacctgtg acaacacagc
tgtgagccag

3061 ggcaaaccac cactgtcac tggctcgaga gtctgggcag aggtctgac
cctccaccct

3121 ttaaaactgga tgccggggcc tggctgggccc caatgccaag tggttatggc
aacctgact

3181 atctggtctt aacatgtagc tcaggaagtg gaggcgctaa tgtcccaat
ccctggggat

3241 tcttgattcc agctattcat gtaagcagag ccaacctgcc tatttctgta
ggtgcgactg

3301 ggatgttagg agcacagcaa ggaccagct ctgtagggct ggtgacctga
tacttctcat

3361 aatggcatct agaagttagg ctgagttggc ctactggcc cagcaaacca
gaacttgtct

3421 ttgtccgggc catgttcttg ggctgtcttc taattccaaa gggttggttg
gtaaagctcc

3481 acccccttct cctctgccta aagacatcac atgtgtatac acacacgggt
gtatagatga

3541 gttaaaagaa tgtcctcgct ggcaccta ttttgtctta agtttttttg
gaggagaaa

3601 ggaacaaggc aagggaagat gtgtagcttt ggctttaacc aggcagcctg
ggggtccca

3661 agcctatgga accctggtac aaagaagaga acagaagcgc cctgtgagga
gtgggatttg

3721 tttttctgta gaccagatga gaaggaaaca ggccctgttt tgtacatagt
tgcaacttaa

3781 aatttttggc ttgcaaaata tttttgtaat aaagatttct gggtaacaat
aaaaaaaaa

3841 aaaaa

[SEQ ID NO: 20]

Translation = MEPAGPAPGRLGPLLLCLLLSASCFTGATGKELKVTQPEKSVS
 VAAGDSTVLNCTLTSLLPVGPIRWYRGVGPSRLLIYSFAGEYVPRI RNVSDTTKRNNM
 DFSIRISNVTPADAGIYYCVKFQKGSSEPDTEIQSGGGTEVYVLAKPSPPEVSGPADR
 GIPDQKVNFTCKSHGFSPRNITLKWFKDGQELHPLETTVNPSGKNVSYNISSTVRVVL
 NSMDVNSKVICEVAHITLDRSPLRGIANLSNFIRVSP TVKVTQQSPTSMNQVNLTCRA
 ERFYPEDLQLIWLENGNVRNDTPKNLTKN TDGTNYTSLFLVNSSAHREDVVFTCQV
 KHDQQPAITRNHTVLGFAHSSDQGSMTFPDNNATHNWNVFIGVGACALLVVLMAA
 LYLLRIKQKKAKGSTSSTRLHEPEKNAREITQVQSLIQDTNDINDITYADLNLPKEKK
 PAPRAPEPNNHTEYAS IETGKVP RPEDTLTYADLDMVHLSRAQPAPKPEPSFSEYASV
 QVQRK

LOCUS	NM_001291021 ARNm de 3389 pb lineal ROD 15-FEB-2015
DEFINICIÓN	Proteína reguladora de señales alfa (Sirpa) de <i>Mus musculus</i> , variante 6 de transcrito, ARNm.
REGISTRO	NM_001291021 XM_006498987
VERSIÓN	NM_001291021.1 GI:597436920
FUENTE	<i>Mus musculus</i> (Ratón doméstico)

[SEQ ID NO: 22]

1 cggaaggtg cgggcgcgag gagggggcgc tcggccgggc cgccctcgcg
 ctggcctcgc

61 gacggctccg cacagcccgc actcgctctg cgagctgtcc ccgctcgcg
 ttgctctccg

121 atctccgtcc ccgctccctc tccctcttcc tctccccctc tttccttctc
 cctcgctatc

181 cgtcccccg cccccgtgcc tctggctctg cgctggctc cctcgggtcc
 gctccccctt

241 cccgccggcc tggcccggcg tcacgtccc ggagtctccc cgctcggcgg
 cgtctcattg

301 tgggagggg tcagatcacc ccgccggcg gtggcgctgg ggggcagcgg
 agggggagg

361 gccttagtcg ttgcgccgcg ccgccgcc gcctgccgag cgcgtcacc
 gccgtctcc

ES 2 950 399 T3

421 ctcccttgctc tgcagccgcg gcccatggag cccgccggcc cggccccctgg
ccgcctaggg

481 ccgctgctgc tctgcctgct gctctccgcg tcctgtttct gtacaggagc
cacggggaag

541 gaactgaagg tgactcagcc tgagaaatca gtgtctgttg ctgctgggga
ttcgaccgtt

601 ctgaactgca ctttgacctc cttgttgccg gtgggaccca ttaggtggta
cagaggagta

661 gggccaagcc ggctgttgat ctacagtttc gcaggagaat acgttcctcg
aattagaaat

721 gtttcagata ctactaagag aaacaatatg gacttttcca tccgtatcag
taatgtcacc

781 ccagcagatg ctggcatcta ctactgtgtg aagtccaga aaggatcatc
agagcctgac

841 acagaaatac aatctggagg gggaacagag gtctatgtac tcgataataa
tgctaccac

901 aactggaatg tcttcatcgg tgtgggcgtg gcgtgtgctt tgctcgtagt
cctgctgatg

961 gctgctctct acctcctcgg gatcaaacag aagaaagcca aggggtcaac
atcttcaca

1021 cggttgacg agcccgagaa gaacgccagg gaaataaccc aggtacagtc
tttgatccag

1081 gacacaaatg acatcaacga catcacatac gcagacctga atctgccccaa
agagaagaag

1141 cccgcacccc gggcccctga gcctaacaac cacacagaat atgcaagcat
tgagacaggc

1201 aaagtgccta ggccagagga taccctcacc tatgctgacc tggacatggt
ccacctcagc

1261 cgggcacagc cagcccccaa gctgagcca tctttctcag agtatgctag
tgtccaggtc

1321 cagaggaagt gaatggggct gtggtctgta ctaggcccca tccccacaag
ttttcttgtc

1381 ctacatggag tggccatgac gaggacatcc agccagccaa tcctgtcccc
agaaggccag

1441 gtggcacggg tcctaggacc aggggtaagg gtggcctttg tcttcctcc
gtggctcttc

1501 aacacctctt gggcacccac gtccccttct tccggaggct ggggtgttgca
gaaccagagg

1561 gcgaactgga gaaagctgcc tggaatccaa gaagtgttgt gcctcggccc
atcactcgtg

ES 2 950 399 T3

1621 ggtctggatc ctggtcttgg caaccccagg ttgcgtcctt gatgttccag
agcttggtct

1681 tctgtgtgga gaagagctca ccatctctac ccaacttgag ctttgggacc
agactccctt

1741 tagatcaaac cgccccatct gtggaagaac tacaccagaa gtcagcaagt
tttcagccaa

1801 cagtgtctggc ctccccacct cccaggctga ctagccctgg ggagaaggaa
ccctctctctc

1861 ctagaccagc agagactccc tgggcatggt cagtgtggcc ccacctccct
tccagtccca

1921 gcttgcttcc tccagctagc actaactcag cagcatcgct ctgtggacgc
ctgtaaatta

1981 ttgagaaatg tgaactgtgc agtcttaaag ctaagggtgtt agaaaatttg
atttatgctg

2041 tttagttggt gttgggtttc ttttcttttt aatttctttt tcttttttga
ttttttttct

2101 ttcccttaaa acaacagcag cagcatcttg gctctttgtc atgtgttgaa
tggttgggtc

2161 ttgtgaagtc tgaggtctaa cagtttattg tcctggaagg attttcttac
agcagaaaca

2221 gatttttttc aaattcccag aatcctgagg accaagaagg atccctcagc
tgctacttcc

2281 agcaccagc gtcactggga cgaaccaggc cctgttctta caaggccaca
tggctggccc

2341 tttgcctcca tggctactgt ggtaagtgc gccttgtctg acccaatgct
gacctaatgt

2401 tggccattcc acattgaggg gacaaggcca gtgatgcccc ctttactca
caagcacttc

2461 agaggcatgc agagagaagg gacactcggc cagctctctg aggtaatcag
tgcaaggagg

2521 agtccgtttt ttgccagcaa acctcagcag gatcacactg gaacagaacc
tggtcatacc

2581 tgtgacaaca cagctgtgag ccagggcaaa ccaccactg tctactggctc
gagagtctgg

2641 gcagaggctc tgaccctcca ccctttaaac tggatgccgg ggcttggctg
ggcccaatgc

2701 caagtgggta tggcaaccct gactatctgg tcttaacatg tagctcagga
agtggaggcg

2761 ctaatgtccc caatccctgg ggattcctga ttccagctat tcatgtaagc
agagccaacc

2821 tgcctatttc tgtagggtgcg actgggatgt taggagcaca gcaaggaccc
agctctgtag

2881 ggctggtgac ctgatacttc tcataatggc atctagaagt taggctgagt
tggcctcact

2941 ggccagcaa accagaactt gtctttgtcc gggccatgtt cttgggctgt
cttctaattc

3001 caaagggttg gttggtaaag ctccaccccc ttctcctctg cctaaagaca
tcacatgtgt

3061 atacacacac ggggtgtatag atgagttaaa agaatgtcct cgctggcatc
ctaattttgt

3121 ctttaagtttt tttggaggga gaaaggaaca aggcaaggga agatgtgtag
ctttggcttt

3181 aaccaggcag cctgggggct cccaagccta tggaaccctg gtacaaagaa
gagaacagaa

3241 gcgccctgtg aggagtggga tttgtttttc tgtagaccag atgagaagga
aacaggccct

3301 gttttgtaca tagttgcaac ttaaaatttt tggcttgcaa aatatttttg
taataaagat

3361 ttctgggtaa caataaaaaa aaaaaaaaa

[SEQ ID NO: 23]

5

Translation = MEPAGPAPGRLGPLLLCLLSASCFTGATGKELKVTQPEKSVS
VAAGDSTVLNCTLTSLLPVGPIRWYRGVGPSRLLIYSFAGEYVPRI RNVS DTTKRNNM
DFSIRISNVTPADAGIYYCVKFQKGSSEPDTEIQSGGGTEVYVLDN NATHNWNVFIGV
GVACALLVLLMAALYLLRIKQKKAKGSTSSTRLHEPEKNAREITQVQSLIQDTNDIN
DITYADLNLPKEKKPAPRAPEPNHTEYAS IETGKVPRPEDTLTYADLDMVHLSRAQP
APKPEPSFSEYASVQVQRK

LOCUS	NM_001291022 ARNm de 3020 pb lineal ROD 15-FEB-2015
DEFINICIÓN	Proteína reguladora de señales alfa (Sirpa) de <i>Mus musculus</i> , variante 7 de transcrito, ARNm.
REGISTRO	NM_001291022
VERSIÓN	NM_001291022.1 GI:597436963
FUENTE	<i>Mus musculus</i> (Ratón doméstico)

[SEQ ID NO: 24]

10

1 cggaaggtg cgggcgcgag gagggggcgc tcggccgggc cgccctcgcg
ctggcctcgc

61 gacggctccg cacagcccgc actcgctctg cgagctgtcc ccgctcgcgc
ttgctctccg

ES 2 950 399 T3

121 atctccgtcc ccgtccctc tccctcttcc tctccccctc tttccttctc
cctcgctatc

181 cgctcccccg ccccgtgcc tctggctctg cgctgggtc cctcgggtcc
gctccccctt

241 cccgccggcc tggcccggcg tcacgtccc ggagtctccc cgctcggcg
cgtctcattg

301 tgggaggggg tcagatcacc ccgccggcg gtggcgctgg ggggcagcg
agggggagg

361 gccttagctg ttgcccgcg ccgccgcc gcctgccag cgcgctcacc
gccgtctcc

421 ctccctgtct tgcagcccg gcccatggag cccgccggcc cggccctgg
ccgcctagg

481 ccgctgtctc tctgctgtg gctctcccg tctgtttct gtacagataa
taatgtacc

541 cacaactgga atgtcttcat cgggtgtggc gtggcgctg cttgtctctg
agtctgtctg

601 atggctgtct tctacctct ccgatcaaa cagaagaaag ccaaggggtc
aacatcttcc

661 acacggttgc acgagccga gaagaacgcc agggaaataa ccagatcca
ggacacaaat

721 gacatcaacg acatcacata cgcagacctg aatctgcca aagagaagaa
gcccgaccc

781 cgggcccctg agcctaacaa ccacacagaa tatgcaagca ttgagacagg
caaagtgcct

841 aggccagagg ataccctcac ctatgtgac ctggacatgg tccacctcag
ccgggcacag

901 ccagccccca agcctgagcc atctttctca gagtatgcta gtgtccaggt
ccagaggaag

961 tgaatggggc tgtggtctgt actaggcccc atccccacaa gttttcttgt
cctacatgga

1021 gtggccatga cgaggacatc cagccagcca atcctgtccc cagaaggcca
gttggcacgg

1081 gtcctaggac caggggtaag ggtggccttt gtcttccctc cgtggctctt
caacacctct

1141 tgggcaccca cgtccccttc ttccggaggc tgggtgttgc agaaccagag
ggcgaactgg

1201 agaaagctgc ctggaatcca agaagtgtt tgcctcggcc catcactcgt
gggtctggat

1261 cctggtcttg gcaaccccag gttgcgtcct tgatgttcca gagcttggtc
ttctgtgtgg

ES 2 950 399 T3

1321 agaagagctc accatctcta cccaacttga gctttgggac cagactccct
 ttagatcaaaa
 1381 ccgccccatc tgtggaagaa ctacaccaga agtcagcaag ttttcagcca
 acagtgctgg
 1441 cctccccacc tcccaggctg actagccctg gggagaagga accctctcct
 cctagaccag
 1501 cagagactcc ctgggcatgt tcagtgtggc cccacctccc ttccagtccc
 agcttgcttc
 1561 ctccagctag cactaactca gcagcatcgc tctgtggacg cctgtaaatt
 attgagaaat
 1621 gtgaactgtg cagtcttaaa gctaagggtg tagaaaattt gatttatgct
 gtttagttgt
 1681 tgttggggtt cttttctttt taatttcttt ttcttttttg attttttttc
 tttcccttaa
 1741 aacaacagca gcagcatctt ggctctttgt catgtgttga atggttgggt
 cttgtgaagt
 1801 ctgaggtcta acagtttatt gtccctggaag gattttctta cagcagaaac
 agattttttt
 1861 caaattccca gaatcctgag gaccaagaag gatccctcag ctgctacttc
 cagcaccag
 1921 cgtcactggg acgaaccagg ccctgttctt acaaggccac atggctggcc
 ctttgctcc
 1981 atggctactg tggtaagtgc agccttgtct gaccaaatgc tgacctaatg
 ttggccattc
 2041 cacattgagg ggacaaggtc agtgatgcc cccttcaact acaagcactt
 cagaggcatg
 2101 cagagagaag ggacactcgg ccagctctct gaggtaatca gtgcaaggag
 gagtccgttt
 2161 tttgccagca aacctcagca ggatcacact ggaacagaac ctggtcatac
 ctgtgacaac
 2221 acagctgtga gccagggcaa accaccact gtcactggct cgagagtctg
 ggagaggct
 2281 ctgacctcc accctttaa ctggatgccg gggcctggct gggcccaatg
 ccaagtgggt
 2341 atggcaaccc tgactatctg gtcttaacat gtagctcagg aagtggaggc
 gctaattgtc
 2401 ccaatccctg gggattcctg attccagcta ttcattgaag cagagccaac
 ctgcctattt
 2461 ctgtaggtgc gactgggatg ttaggagcac agcaaggacc cagctctgta
 ggctggtga

2521 cctgatactt ctcataatgg catctagaag ttaggctgag ttggcctcac
 tggcccagca

2581 aaccagaact tgtctttgtc cgggccatgt tcttgggctg tcttctaatt
 ccaaagggtt

2641 gggttgtaaa gctccacccc cttctcctct gcctaaagac atcacatgtg
 tatacacaca

2701 cgggtgtata gatgagttaa aagaatgtcc tcgctggcat cctaattttg
 tcttaagttt

2761 ttttggaggg agaaaggaac aaggcaaggg aagatgtgta gctttggcct
 taaccaggca

2821 gcctgggggc tcccaagcct atggaaccct ggtacaaaga agagaacaga
 agcgccctgt

2881 gaggagtggg atttgttttt ctgtagacca gatgagaagg aaacaggccc
 tgttttgtac

2941 atagttgcaa cttaaaatth ttggcttgca aaatatthtt gtaataaaga
 tttctgggta

3001 acaataaaaa aaaaaaaaaa

[SEQ ID NO: 25]

5

Translation = MEPAGPAPGRLGPLLLCLLLSASCFCTDNNATHNWNVFIGVGVA
 CALLVLLMAALYLLRIKQKKAKGSTSSTRLHEPEKNAREITQIQDTNDINDITYADL
 NLPKEKKPAPRAPEPNNHTEYASJETGKVPREDTLTYADLDMVHLSRAQPAPKPEPS
 FSEYASVQVQRK

LOCUS	NM_009020 ARNm de 3393 pb lineal ROD 15-FEB-2015
DEFINICIÓN	Gen 2 activador de la recombinación (Rag2) de <i>Mus musculus</i> , ARNm.
REGISTRO	NM_009020
VERSIÓN	NM_009020.3 GI:144227233
FUENTE	<i>Mus musculus</i> (Ratón doméstico)

[SEQ ID NO: 26]

10

1 actctaccct gcagccttca gcttggcaca aactaaacag tgactcttcc
 ccaagtgccg

61 agtttaattc ctggcttggc cgaaaggatt cagagaggga taagcagccc
 ctctggcctt

121 cagtgcctaaa ataagaaaga gtatttcaca tccacaagca ggaagtacac
 ttcatacctc

181 tctaagataa aagacctatt cacaatcaaa aatgtccctg cagatggtaa
 cagtgggtca

241 taacatagcc ttaattcaac caggcttctc acttatgaat tttgatggcc
 aagttttctt

ES 2 950 399 T3

301 ctttgccag aaaggtggc ctaagagatc ctgtcctact ggagtcttcc
atattgatat

361 aaaacaaaat catctcaaac tgaagcctgc aatcttctct aaagattcct
gctacctccc

421 acctcttcgt tatccagcta ctgtctcata caaaggcagc atagactctg
acaagcatca

481 atatatcatt cacggaggga aaacaccaa caatgagctt tccgataaga
tttatatcat

541 gtctgtcgct tgcaagaata acaaaaaagt tactttccgt tgcacagaga
aagacttagt

601 aggagatgtc cctgaacca gatacggcca ttccattgac gtggtgtata
gtcgaggga

661 aagcatgggt gttctctttg gaggacgttc atacatgcct tctaccaga
gaaccacaga

721 aaaatggaat agtgtagctg actgcctacc ccatgttttc ttgatagatt
ttgaatttgg

781 gtgtgtctaca tcatatatcc tcccagaact tcaggatggg ctgtcttttc
atgtttctat

841 tgccagaaac gataccgttt atattttggg aggacactca cttgccagta
atatacgccc

901 tgctaacttg tatagaataa gagtggacct tcccctgggt accccagcag
tgaattgcac

961 agtcttgcca ggaggaatct ctgtctccag tgcaatcctc actcaaaca
acaatgatga

1021 atttgttatt gtgggtggtt atcagctgga aaatcagaaa aggatggtct
gcagccttgt

1081 ctctctaggg gacaacacga ttgaaatcag tgagatggag actcctgact
ggacctcaga

1141 tattaagcat agcaaaatat ggtttggaag caacatggga aacgggacta
tttcccttgg

1201 cataccagga gacaataagc aggctatgtc agaagcattc tatttctata
ctttgagatg

1261 ctctgaagag gatttgagtg aagatcagaa aattgtctcc aacagtcaga
catcaacaga

1321 agatcctggg gactccactc ctttgaaga ctgagaggaa ttttgtttca
gtgctgaagc

1381 aaccagtttt gatggtgacg atgaatttga cacctacaat gaagatgatg
aagatgacga

1441 gtctgtaacc ggctactgga taacatgttg ccctacttgt gatgttgaca
tcaatacctg

ES 2 950 399 T3

1501 ggttcggttc tattcaacgg agctcaataa acccgccatg atctattggt
ctcatgggga

1561 tgggcactgg gtacatgccc agtgcattgga tttggaagaa cgcacactca
tccacttgtc

1621 agaaggaagc aacaagtatt attgcaatga acatgtacag atagcaagag
cattgcaaac

1681 tcccaaaaga aacccccct taaaaaac tccaatgaaa tccctccaca
aaaaaggctc

1741 tgggaaagtc ttgactcctg ccaagaaatc cttccttaga agactggttg
attaatttag

1801 caaaagcccc tcagactcag gtatatgtct ctctgaatct actttcaatc
ataaacatta

1861 ttttgatttt tgtttactga aatctctatg ttatgtttta gttatgtgaa
ttaagtgtg

1921 ttgtgattta ttgttaagta taactattct aatgtgtgtt ttttaacatc
ttatccagga

1981 atgtcttaaa tgagaaatgt tatacagttt tccattaagg atatcagtga
taaagtatag

2041 aactcttaca ttattttgta acaatctaca tattgaatag taactaaata
ccaataaata

2101 aactaatgca caaaaagtta agttcttttg tgtaataagt agcctatagt
tggtttaaac

2161 agttaaaacc aacagctata tcccacacta ctgctgttta taaattttaa
ggtggcctct

2221 ggtttatact tatgagcaga attatatata ttggtcaata ccatgaagaa
aaatttaatt

2281 ctatatcaag ccaggcatgg tgatggtgat acatgcctgt aatcctggca
cttaggaagt

2341 ggaagaagga agtttgtgag tttgatgctt gttgaggtat gaccttttgc
tatgtattgt

2401 agtgatgag cccaagacc tgcttgacct agagacaaga gagtccacac
atagatccaa

2461 gtaatgctat gtgaccttgc cccccggtta cttgtgatta ggtgaataaa
gatgtcaaca

2521 gccaatagct ggcagaaga gccaaaagtg gggattgagg gtaccctggc
ttgatgtagg

2581 aggagaccat gaggaaggg gagaaaaag tgatggagga ggagaaagat
gccatgagct

2641 aggagttaag aaagcatggc catgagtgtt ggccaattgg agttaagagc
agcccagatg

ES 2 950 399 T3

2701 aaacatagta agtaataact cagggttatc gatagaaaat agatttttagt
gccgtactct

2761 cccagccct agagctgact atggcttact gtaaataataa agtttgtatg
tgtcttttat

2821 ccaggaacta aatgggtcaaa ggtggagtag aaactctgga ttgggattaa
atttttctac

2881 aacaaatgct ggcctgggct agattttatc tcatatccga aggctgacag
aacacagagc

2941 actggtaaca ttgccacctg ccatgcacaa agacctgagt ctaatactgt
ggacattttc

3001 ttgaagtatc tacatgtact tctggagtga aaacatattc caacaatatg
cctttgttta

3061 aatcactcac tcactttggg ccctcacatt atatcctttc aaaatcaatg
gttcaccct

3121 ttgaaaatgc ttagccatag tccctcatct tccttaaaga cagttgtcat
ctctggaaat

3181 agtcacatgt cattcaaggc ccaatactgt gcagctctga agtatggcat
taccacttta

3241 agtgaaaagt gaaatatgaa catgagctca gacaaagggt tgggactatc
actctcaagg

3301 aggtctact gctaagtcct gaactgcttt cacatgaata cagaaattat
aacaaaaaat

3361 atgtaatcaa taaaaagaaa actttcatat tcc

[SEQ ID NO: 27]

Translation = MSLQMVTVGHNIALIQPGFSLMNF DGQVFFFGQKGWPKRSCPTG
VFHF DIKQ NHLKLKPAIFSKDSCYLPLRYPATCSYKGSIDSKHQYIIHGGKTPNNE
LSDKIYIMSVACKNNKKVTFRCTEKDLVGDVPEPRYGHSIDVVYSRGKSMGVLFGGRS
YMPSTQRTTEKWN SVADCLPHVFLIDFEFGCATSYILPELQDGLSFHVS IARNDTVYI
LGGHSLASNIRPANLYRIRVDLPLGTPAVNCTVLPGGISVSSAILTQTNNDEFVIVGG
YQLENQKRMVCSLVSLGDNTIEISEMETPDWTS DIKHSKIWFSGSNMGNGTIFLGIPGD
NKQAMSEAFYFYTLRCSEEDLSEDQKIVSNSQTSTEDPGDSTPFEDSEEFCSAEATS
FDGDDEFDTYNEDDEDESVTGYWITCCPTCDVDINTWVPFYSTELNKPAMIYCSHGD
GHWVHAQCMDLEERTLIHLSEGSNKYYCNEHVQIARALQTPKRNPLQKPPMKSLHKK
GSGKVLTPAKKSFLRRLFD

LOCUS	NM_013563 ARNm de 1612 pb lineal ROD 15-FEB-2015
DEFINICIÓN	Receptor de interleucina 2 de <i>Mus musculus</i> , cadena gamma (I12ry), ARNm.
REGISTRO	NM_013563
VERSIÓN	NM_013563.3 GI:118129799
FUENTE	<i>Mus musculus</i> (Ratón doméstico)

[SEQ ID NO: 28]

1 gacacagact acacccagag aaagaagagc aagcaccatg ttgaaactat
 tattgtcacc

 61 tagatccttc ttagtccttc agctgctcct gctgagggca ggggtggagct
 ccaaggtcct

 121 catgtccagt gcgaatgaag acatcaaagc tgatttgatc ctgacttcta
 cagcccctga

 181 acacctcagt gctcctactc tgccccttcc agagggttcag tgctttgtgt
 tcaacataga

 241 gtacatgaat tgcacttgga atagcagttc tgagcctcag gcaaccaacc
 tcacgctgca

 301 ctataggtac aaggatatctg ataataatac attccaggag tgcagtcact
 atttgttctc

 361 caaagagatt acttctggct gtcagatata aaaagaagat atccagctct
 accagacatt

 421 tgttgtccag ctccaggacc ccagaaaacc ccagaggcga gctgtacaga
 agctaaacct

 481 acagaatctt gtgatccac gggctccaga aaatctaaca ctgagcaatc
 tgagtgaatc

 541 ccagctagag ctgagatgga aaagcagaca tattaaagaa cgctgtttac
 aatacttggc

 601 gcagtaccgg agcaacagag atcgaagctg gacggaacta atagtgaatc
 atgaacctag

 661 attctccctg cctagtgtgg atgagctgaa acggtacaca tttcgggttc
 ggagccgcta

 721 taaccaatc tgtggaagtt ctcaacagtg gagtaaattg agccagcctg
 tccactgggg

 781 gagtcatact gtagaggaga atccttcctt gtttgactg gaagctgtgc
 ttatccctgt

 841 tggcaccatg gggttgatta ttaccctgat ctttgtgtac tgttggttgg
 aacgaatgcc

 901 tccaattccc cccatcaaga atctagagga tctgggttact gaataccaag
 ggaacttttc

 961 ggcctggagt ggtgtgtcta aagggtgac tgagagtctg cagccagact
 acagtgaacg

ES 2 950 399 T3

1021 gttctgccac gtcagcgaga ttcccccaa aggaggggcc ctaggagagg
ggcctggagg

1081 ttctccttgc agcctgcata gcccttactg gcctcccca tggtattctc
tgaagccgga

1141 agcctgaaca tcaatccttt gatggaacct caaagtccta tagtcctaag
tgacgctaac

1201 ctccccctact caccttggca atctggatcc aatgctcact gccttccctt
ggggctaagt

1261 ttcgatttcc tgtcccatgt aactgctttt ctgttccata tgccctactt
gagagtgtcc

1321 cttgcctctt ttccctgcac aagccctccc atgccagcc taacacctt
ccactttctt

1381 tgaagagagt cttaccctgt agcccagggt ggctgggagc tcactatgta
ggccagggtg

1441 gcctccaact cacaggctat cctccacct ctgcctcata agagttgggg
ttactggcat

1501 gcaccaccac acccagcatg gtccttctct tttataggat tctccctccc
tttttctacc

1561 tatgattcaa ctgtttccaa atcaacaaga aataaagttt ttaaccaatg at

[SEQ ID NO: 29]

5

Translation = MLKLLSPRSFLVLQLLLLRAGWSSKVLMSANEDIKADLILTS
TAPEHL SAPTLPLPEVQCFVFNIEYMNCTWNSSSEPQATNLTLHYRYKVSDNNTFQEC
SHYLF SKEITSGCQIQKEDIQLYQTFVVQLQDPQKPQRRVQKLNQLNVI PRAPENL
T LSNLSESQLELRWKSRIKERCLQYLQYRSNRDRSWTELIVNHEPRFSLPSVDELK
RYTFRVRSRYNPICGSSQQWSKWSQPVHWGSHTVEENPSLFALEAVLIPVGTMGIIIT
LIFVYCWLERMPPPIPIKNLEDLVTEYQGNFSAWSGVSKGLTESLQPDYSERFCHVSE
IPPKGGALGEGPGGSPCSLHSPYWPPPCYSLKPEA

LOCUS	NM_000585 ARNm de 2012 pb lineal PRI 15-MAR-2015
DEFINICIÓN	Interleucina 15 (IL15) de <i>Homo sapiens</i> , variante 3 de transcrito, ARNm.
REGISTRO	NM_000585
VERSIÓN	NM_000585.4 GI:323098327
FUENTE	<i>Homo sapiens</i> (Ser humano)

[SEQ ID NO: 30]

10

1 gttgggactc cgggtggcag gcgcccgggg gaatcccagc tgactcgctc
actgccttcg

61 aagtccggcg cccccggga gggaactggg tggccgcacc ctcccggctg
cggtggctgt

ES 2 950 399 T3

121 cgccccccac cctgcagcca ggactcgatg gagaatccat tccaatatat
ggccatgtgg

181 ctcttttgag caatgttcca tcatgttcca tgctgctgac gtcacatgga
gcacagaaat

241 caatgttagc agatagccag cccatacaag atcgtattgt attgtaggag
gcattgtgga

301 tggatggctg ctggaaaccc cttgccatag ccagctcttc ttcaatactt
aaggatttac

361 cgtggctttg agtaatgaga atttcgaaac cacatttgag aagtatttcc
atccagtgc

421 acttggtgtt acttctaaac agtcattttc taactgaagc tggcattcat
gtcttcattt

481 tgggctgttt cagtgcaggg cttcctaaaa cagaagccaa ctgggtgaat
gtaataagt

541 atttgaaaaa aattgaagat cttattcaat ctatgcatat tgatgctact
ttatatacgg

601 aaagtgatgt tcaccccgat tgcaaagtaa cagcaatgaa gtgctttctc
ttggagttac

661 aagttatttc acttgagtcc ggagatgcaa gtattcatga tacagtagaa
aatctgatca

721 tcctagcaaa caacagtttg tcttctaagt ggaatgtaac agaactctgga
tgcaaagaat

781 gtgaggaact ggaggaaaaa aatattaaag aatttttgca gagttttgta
catattgtcc

841 aaatgttcat caacacttct tgattgcaat tgattctttt taaagtgttt
ctgttattaa

901 caaacatcac tctgctgctt agacataaca aaacactcgg catttcaaat
gtgctgtcaa

961 aacaagtttt tctgtcaaga agatgatcag accttgatc agatgaactc
ttagaaatga

1021 aggcagaaaa atgtcattga gtaatatagt gactatgaac ttctctcaga
cttactttac

1081 tcattttttt aatttattat tgaaattgta catatttggt gaataatgta
aatgttgaa

1141 taaaaaatatg tacaagtgtt gttttttaag ttgcactgat attttacctc
ttattgcaaa

1201 atagcatttg tttaagggtg atagtcaaat tatgtattgg tggggctggg
taccaatgct

1261 gcagggtcaac agctatgctg gtaggctcct gccagtgtgg aaccactgac
tactggctct

ES 2 950 399 T3

1321 cattgacttc cttactaagc atagcaaaca gaggaagaat ttgttatcag
taagaaaaag

1381 aagaactata tgtgaatcct cttctttata ctgtaattta gttattgatg
tataaagcaa

1441 ctgttatgaa ataaagaaat tgcaataact ggcatataat gtccatcagt
aaatcttgg

1501 ggtgggtggca ataataaact tctactgata ggtagaatgg tgtgcaagct
tgtccaatca

1561 cggattgcag gccacatgag gccacaggaca actttgaatg tggcccaaca
caaattcata

1621 aactttcata catctcggtt ttagctcatc agctatcatt agcggtagtg
tatttaaagt

1681 gtggcccaag acaattcttc ttattccaat gtggcccagg gaaatcaaaa
gattggatgc

1741 ccctggtata gaaaactaat agtgacagtg ttcataattc atgctttccc
aaatacaggt

1801 attttatttt cacattcttt ttgccatggt tatataataa taaagaaaaa
ccctggtgat

1861 ttgttggagc cattgttatc tgacagaaaa taattgttta tattttttgc
actacactgt

1921 ctaaaattag caagctctct tctaattgaa ctgtaagaaa gatgaaatat
ttttgtttta

1981 ttataaattt atttcacctt aaaaaaaaaa aa

[SEQ ID NO: 31]

5

Translation = MRISKPHLRISISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLP
KTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES
GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN
TS

LOCUS	NM_172175 ARNm de 2333 pb lineal PRI 15-MAR-2015
DEFINICIÓN	Interleucina 15 (IL15) de <i>Homo sapiens</i> , variante 2 de transcrito, ARNm.
REGISTRO	NM_172175
VERSIÓN	NM_172175.2 GI:323098328
FUENTE	<i>Homo sapiens</i> (Ser humano)

[SEQ ID NO: 32]

10

1 gttgggactc cgggtggcag gcgcccgggg gaatcccagc tgactcgctc
actgccttcg

61 aagtccggcg cccccggga gggaactggg tggccgcacc ctcccggctg
cgggtggctgt

ES 2 950 399 T3

121 cgccccccac cctgcagcca ggactcgatg gagaatccat tccaatatat
ggccatgtgg

181 ctctttggag caatgttcca tcatgttcca tgctgctgac gtcacatgga
gcacagaaat

241 caatgttagc agatagccag cccatacaag atcgttttca actagtggcc
ccactgtgtc

301 cggaattgat gggttcttgg tctcactgac ttcaagaatg aagccgcgga
ccctcgcggt

361 gagtgttaca gctcttaagg tggcgcacat ggagtttggt ccttctgatg
ttcggatgtg

421 ttcggagttt cttccttctg gtgggttcgt ggtctcgctg gctcaggagt
gaagctacag

481 accttcgcgg aggcattgtg gatggatggc tgctggaaac cccttgccat
agccagctct

541 tcttcaatac ttaaggattt accgtggctt tgagtaatga gaatttcgaa
accacatttg

601 agaagtattt ccatccagtg ctacttgtgt ttacttctaa acagtcattt
tctaactgaa

661 gctggcattc atgtcttcat tttgggatgc agctaataa cccagttggc
ccaaagcacc

721 taacctatag ttatataatc tgactctcag ttcagtttta ctctactaat
gccttcattg

781 tattgggaac catagatttg tgcagctggt tcagtgcagg gcttcctaaa
acagaagcca

841 actgggtgaa tgtaataagt gatttgaaaa aaattgaaga tcttattcaa
tctatgcata

901 ttgatgctac tttatatacg gaaagtgatg ttcaccccag ttgcaaagta
acagcaatga

961 agtgctttct cttggagtta caagttattt cacttgagtc cggagatgca
agtattcatg

1021 atacagtaga aaatctgatc atcctagcaa acaacagttt gtcttcta
gggaatgtaa

1081 cagaatctgg atgcaaagaa tgtgaggaac tggaggaaaa aaatattaaa
gaatttttgc

1141 agagttttgt acatattgtc caaatgttca tcaacacttc ttgattgcaa
ttgattcttt

1201 ttaaagtgtt tctgttatta acaaacatca ctctgctgct tagacataac
aaaacactcg

1261 gcatttcaaa tgtgctgtca aaacaagttt ttctgtcaag aagatgatca
gaccttgat

1321 cagatgaact cttagaaatg aaggcagaaa aatgtcattg agtaatatag
tgactatgaa

1381 cttctctcag acttacttta ctcatttttt taatttatta ttgaaattgt
acataattgt

1441 ggaataatgt aaaatgttga ataaaaatat gtacaagtgt tgttttttaa
gttgactga

1501 tattttacct cttattgcaa aatagcattt gtttaagggt gatagtcaaa
ttatgtattg

1561 gtggggctgg gtaccaatgc tgcagggtcaa cagctatgct ggtaggctcc
tgccagtgtg

1621 gaaccactga ctactggctc tcattgactt cttactaag catagcaaac
agaggaagaa

1681 tttgttatca gtaagaaaaa gaagaactat atgtgaatcc tcttctttat
actgtaattt

1741 agttattgat gtataaagca actgttatga aataaagaaa ttgcaataac
tggcatataa

1801 tgtccatcag taaatcttgg tgggtggggc aataataaac ttctactgat
aggtagaatg

1861 gtgtgcaagc ttgtccaatc acggattgca ggccacatgc ggcccaggac
aactttgaat

1921 gtggcccaac acaaattcat aaactttcat acatctcggt ttagctcat
cagctatcat

1981 tagcggtagt gtatttaaag tgtggcccaa gacaattctt cttattccaa
tgtggccag

2041 ggaaatcaaa agattggatg cccctggtat agaaaaactaa tagtgacagt
gttcataattt

2101 catgctttcc caaatacagg tattttatct tcacattctt tttgccatgt
ttatataata

2161 ataaagaaaa accctgttga tttgttgagg ccattgttat ctgacagaaa
ataattgttt

2221 atattttttg cactacactg tctaaaatta gcaagctctc ttctaattga
actgtaagaa

2281 agatgaaata tttttgtttt attataaatt tatttcacct taataaaaaa aaa

[SEQ ID NO: 33]

5

Translation = MVLGTIDLCSFCSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDA
TLYTESDVHPCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVT
ESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINITS

LOCUS	NM_008357 ARNm de 1297 pb lineal ROD 15-FEB-2015
DEFINICIÓN	Interleucina 15 (IL15) de <i>Mus musculus</i> , variante 1 de transcrito, ARNm.
REGISTRO	NM_008357
VERSIÓN	NM_008357.2 GI:363000959
FUENTE	<i>Mus musculus</i> (Ratón doméstico)

[SEQ ID NO: 34]

1 ttcttgacca agacttcaat actcagtggc actgtattcc ccttctgtcc
 agccactctt
 61 ccccagagtt ctcttcttca tcctccccct tgcagagtag ggcagcttgc
 aggtcctcct
 121 gcaagtctct cccaattctc tgcgccccaa agacttgagc tgcattctct
 tacgcgctgc
 181 agggaccttg ccagggcagg actgcccccg ccagttgca gagttggacg
 aagacgggat
 241 cctgctgtgt ttggaaggct gaggccaca tctaacagct cagagaggtc
 aggaagaat
 301 ccaccttgac acatggccct ctggctcttc aaagcactgc ctcttcatgg
 tccttgctgg
 361 tgaggctctt aagaacacag aaacccatgt cagcagataa ccagcctaca
 ggaggccaag
 421 aagagttctg gatggatggc agctggaagc ccacgccat agccagctca
 tcttcaacat
 481 tgaagctctt acctgggcat taagtaatga aaattttgaa accatatatg
 aggaatacat
 541 ccatctctgt ctacttgtgt ttccttctaa acagtcactt tttaactgag
 gctggcatte
 601 atgtcttcat tttgggctgt gtcagtgtag gtctccctaa aacagaggcc
 aactggatag
 661 atgtaagata tgacctggag aaaattgaaa gccttattca atctattcat
 attgacacca
 721 ctttatacac tgacagtgac tttcatccca gttgcaaagt tactgcaatg
 aactgcttct
 781 tcctggaatt gcaggttatt ttacatgagt acagtaacat gactcttaat
 gaaacagtaa
 841 gaaacgtgct ctaccttgca aacagcactc tgtcttctaa caagaatgta
 gcagaatctg
 901 gctgcaagga atgtgaggag ctggaggaga aaaccttcac agagtttttg
 caaagcttta
 961 tacgcattgt ccaaattgtc atcaacacgt cctgactgca tgcagacctc
 ttccgtgttt
 1021 ctgttattaa ggtacctcca cctgctgctc agaggcagca cagctccatg
 catttgaaat
 1081 ctgctgggca aactaagctt cctaacaagg agataatgag ccacttggat
 cacatgaaat
 1141 cttggaaatg aagagaggaa aagagctcgt ctgagactta tttttgcttg
 cttattttta
 1201 atttattgct tcatttgtac atatttgtaa tataacagaa gatgtggaat
 aaagttgtat
 1261 ggatatttta tcaattgaaa tttaaaaaaa aaaaaa

[SEQ ID NO: 35]

Translation = MKILKPYMRNTSISCYLCFLLNSHFLTEAGIHVFILGCVSVGLP
KTEANWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLELQVILHEY
SNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCKECEEELEKTFTEFLQSFIRIVQMF
FIN
TS

LOCUS	NM_001254747 ARNm de 1287 pb lineal ROD 15-FEB-2015
DEFINICIÓN	Interleucina 15 (IL15) de <i>Mus musculus</i> , variante 2 de transcrito, ARNm.
REGISTRO	NM_001254747
VERSIÓN	NM_001254747.1 GI:363000983
FUENTE	<i>Mus musculus</i> (Ratón doméstico)

[SEQ ID NO: 36]

1 ttcttgacca agacttcaat actcagtggc actgtattcc ccttctgtcc
agccactctt

61 cccagagtt ctcttcttca tcctccccct tgcagagtag ggcagcttgc
aggtcctcct

121 gcaagtctct cccaattctc tgcgccc aaa agacttgca gcatctcct
tacgcgtgc

181 agggaccttg ccagggcagg actgccccg ccagttgca gattggacg
aagacgggat

241 cctgctgtgt ttggaaggct gattccaca tctaacagct cagagagaat
ccaccttgac

301 acatggccct ctggctcttc aaagcactgc ctcttcattg tccttgctgg
tgaggtcctt

361 aagaacacag aaacccatgt cagcagataa ccagcctaca ggaggccaag
aagattctg

421 gatggatggc agctggaagc ccatcgccat agccagctca tcttcaacat
tgaagctctt

481 acctgggcat taagtaatga aaattttgaa accatatatg aggaatacat
ccatctcgtg

ES 2 950 399 T3

541 ctacttgtgt ttccttctaa acagtcactt tttaactgag gctggcattc
atgtcttcat

601 tttgggctgt gtcagtgtag gtctccctaa aacagaggcc aactggatag
atgtaagata

661 tgacctggag aaaattgaaa gccttattca atctattcat attgacacca
ctttatacac

721 tgacagtgac tttcatccca gttgcaaagt tactgcaatg aactgctttc
tcctggaatt

781 gcaggttatt ttacatgagt acagtaacat gactcttaat gaaacagtaa
gaaacgtgct

841 ctaccttgca aacagcactc tgtcttctaa caagaatgta gcagaatctg
gctgcaagga

901 atgtgaggag ctggaggaga aaaccttcac agagtttttg caaagcttta
tacgcattgt

961 ccaaagtgtc atcaacacgt cctgactgca tgcgagcctc ttccgtgttt
ctgttattaa

1021 ggtacctcca cctgctgctc agaggcagca cagctccatg catttgaaat
ctgctgggca

1081 aactaagctt cctaacaagg agataatgag ccacttggat cacatgaaat
cttggaatg

1141 aagagaggaa aagagctcgt ctgagactta tttttgcttg cttattttta
atttattgct

1201 tcatttgtac atatttgtaa tataacagaa gatgtggaat aaagttgtat
ggatatttta

1261 tcaattgaaa tttaaaaaaaa aaaaaaa

[SEQ ID NO: 35]

Translation = MKILKP YMRNTSISCYLCFLNSHFLTEAGIHVFILGCVSVGLP
KTEANWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLELQVILHEY
SNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCKECELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFIN
TS

REIVINDICACIONES

1. Un ratón modificado genéticamente, que comprende:

- 5 una mutación anuladora en el gen *SIRPα* de ratón en el locus del gen *SIRPα* de ratón y una secuencia de ácido nucleico incorporada en el genoma del ratón modificado genéticamente, secuencia que codifica una proteína *SIRPα* humana y está unida operativamente a un promotor del gen *SIRPα* de ratón endógeno en el locus del gen *SIRPα* de ratón; y
- 10 una mutación anuladora en el gen *IL-15* de ratón en el locus del gen *IL-15* de ratón y una secuencia de ácido nucleico incorporada en el genoma del ratón modificado genéticamente, secuencia que codifica una proteína *IL-15* humana y está unida operativamente a un promotor del gen *IL-15* de ratón endógeno en el locus del gen *IL-15* de ratón,
- 15 en donde el ratón modificado genéticamente expresa la proteína *SIRPα* humana y la proteína *IL-15* humana, en donde el ratón modificado genéticamente es inmunodeficiente y comprende una inactivación del gen *Rag2* y una inactivación del gen *IL2rg*, una inactivación del gen *Rag2* o una inactivación del gen *IL2rg*, y en donde cuando el ratón modificado genéticamente comprende un injerto de células hematopoyéticas humanas, el ratón modificado genéticamente comprende linfocitos intraepiteliales (LIE) humanos en el pulmón, o intestino delgado y placas de Peyer, del ratón modificado genéticamente.
- 20 2. El ratón modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la mutación anuladora es una eliminación de al menos los exones 2 a 4 de *SIRPα* de ratón, en donde el ratón modificado genéticamente es heterocigoto para el alelo que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína *SIRPα* humana, o en donde el ratón modificado genéticamente es homocigoto para el alelo que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína *SIRPα* humana.
- 25 3. El ratón modificado genéticamente de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la proteína *SIRPα* humana es un fragmento funcional de una proteína *SIRPα* humana de longitud completa, y/o la proteína *IL-15* humana es un fragmento funcional de una proteína *IL-15* humana de longitud completa.
- 30 4. El ratón modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el fragmento funcional comprende un dominio extracelular de *SIRPα* humana.
5. El ratón modificado genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la mutación anuladora es una eliminación de al menos los exones 5 a 8 de *IL-15* de ratón, en donde el ratón modificado genéticamente es heterocigoto para el alelo que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína *IL-15* humana, o en donde el ratón modificado genéticamente es homocigoto para el alelo que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína *IL-15* humana.
- 35 6. El ratón modificado genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el ratón modificado genéticamente comprende un injerto de células hematopoyéticas humanas.
- 40 7. El ratón modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el ratón modificado genéticamente comprende una infección con un patógeno humano.
- 45 8. El ratón modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el patógeno humano activa, induce y/o se dirige a linfocitos T y/o linfocitos citolíticos naturales (NK), o en donde el patógeno humano es un patógeno que infecta el intestino humano o el pulmón humano.
- 50 9. El ratón modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el ratón modificado genéticamente comprende LIE en el pulmón del ratón modificado genéticamente.
10. El ratón modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el ratón modificado genéticamente comprende LIE en el intestino delgado y placas de Peyer del ratón modificado genéticamente.

FIG. 1

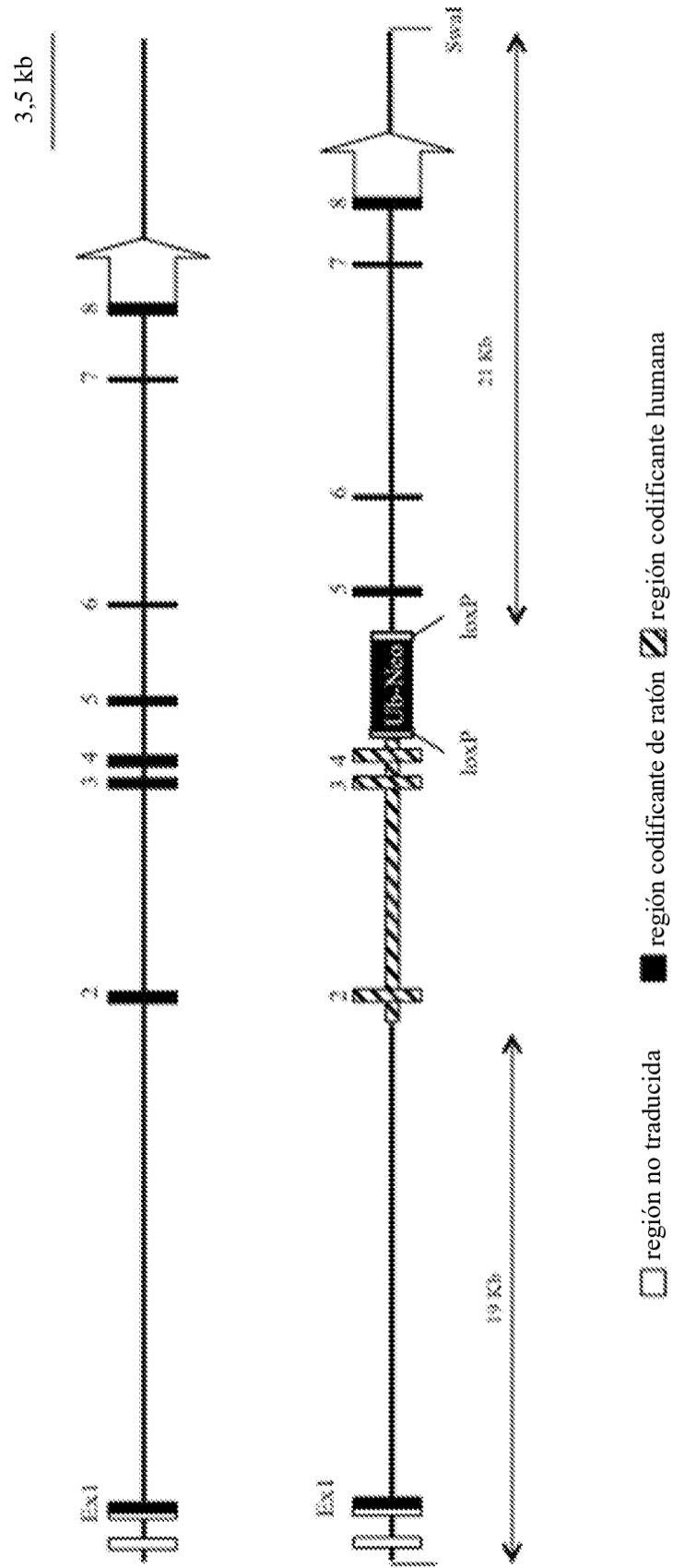


FIG. 2

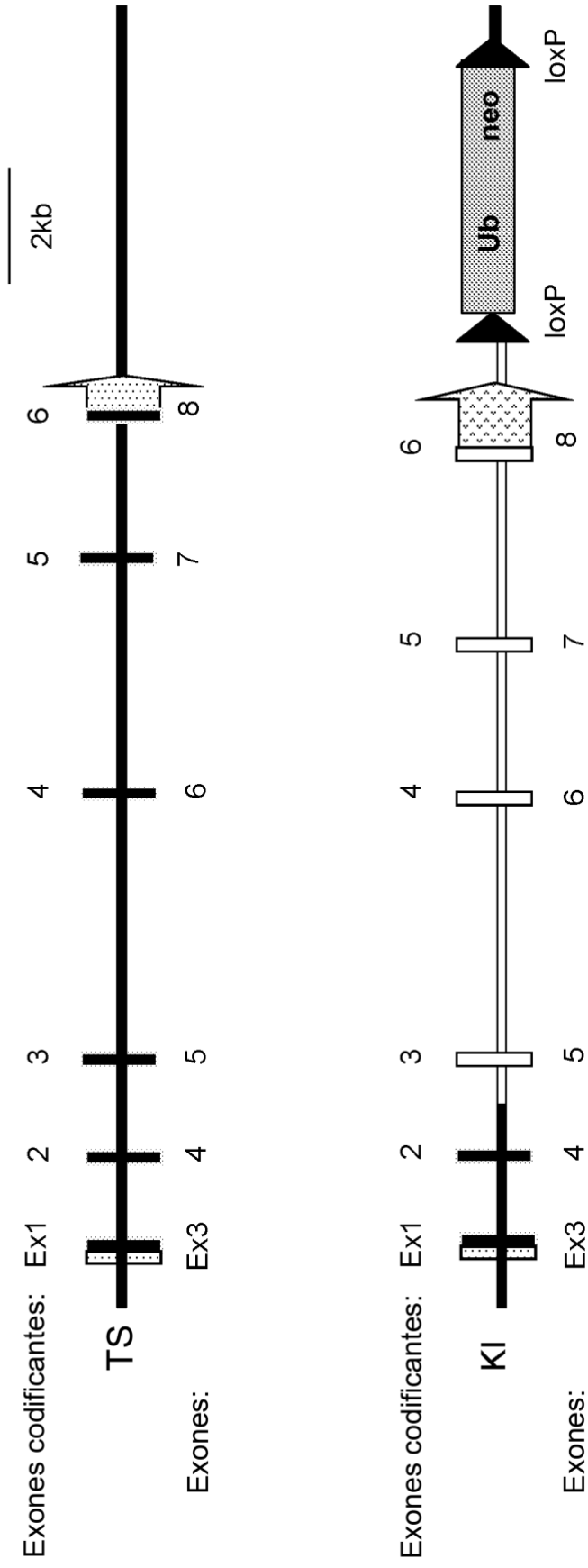


FIG. 3A

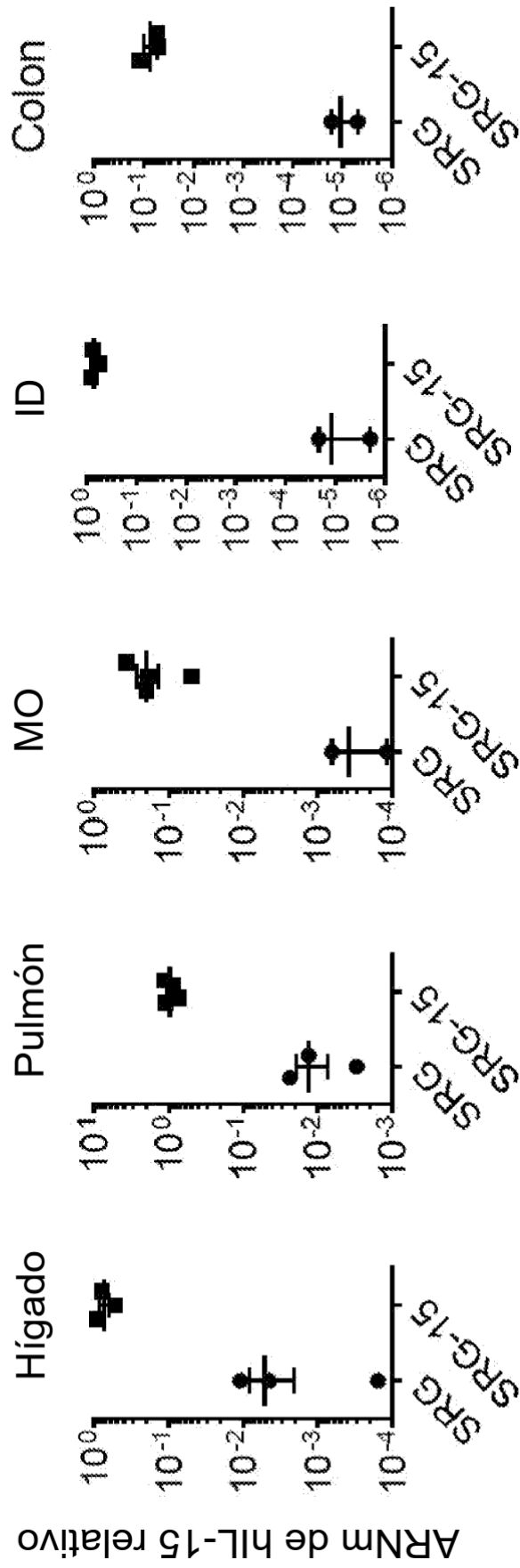


FIG. 3B

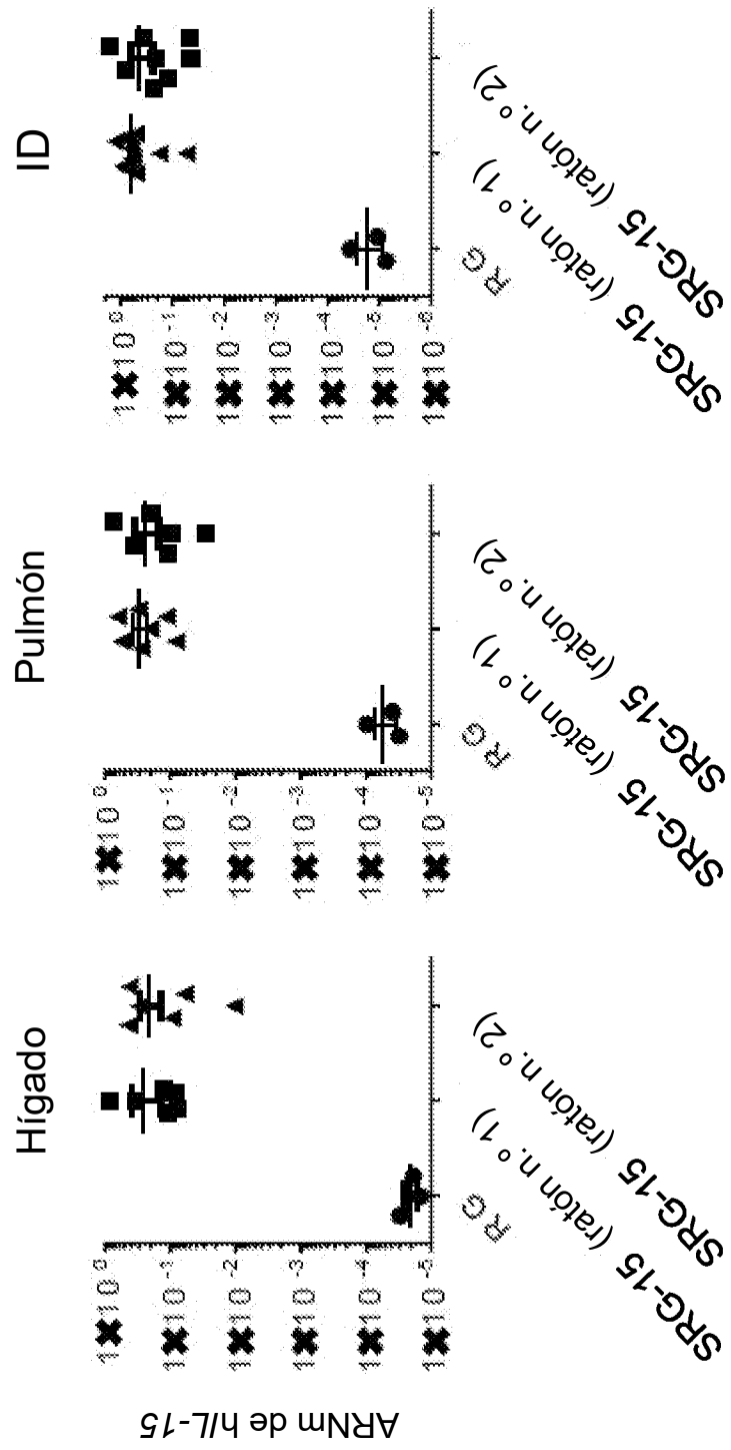
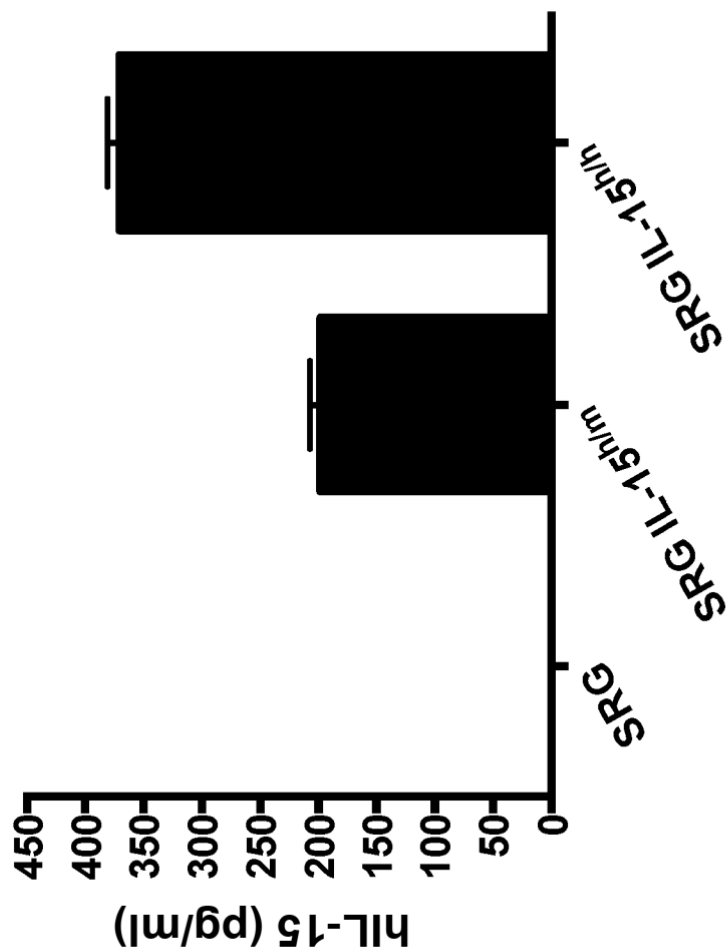


FIG. 4
IL-15 humana observada en suero de SRG hIL-15
después de la inyección de poli I:C



Nivel medio indicado en suero humano sano: 1 -2 pg/ml

FIG. 5A

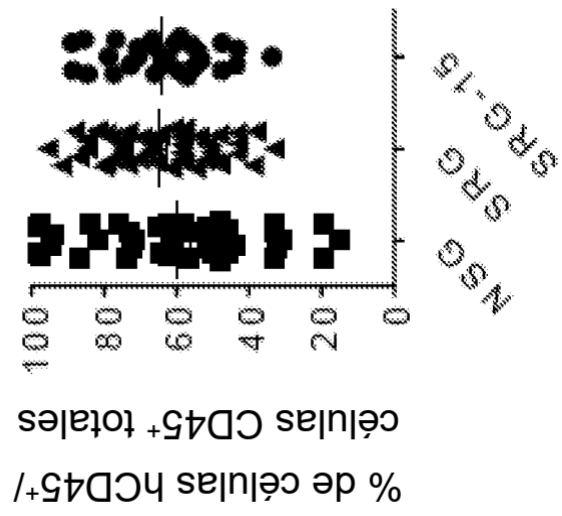


FIG. 5B

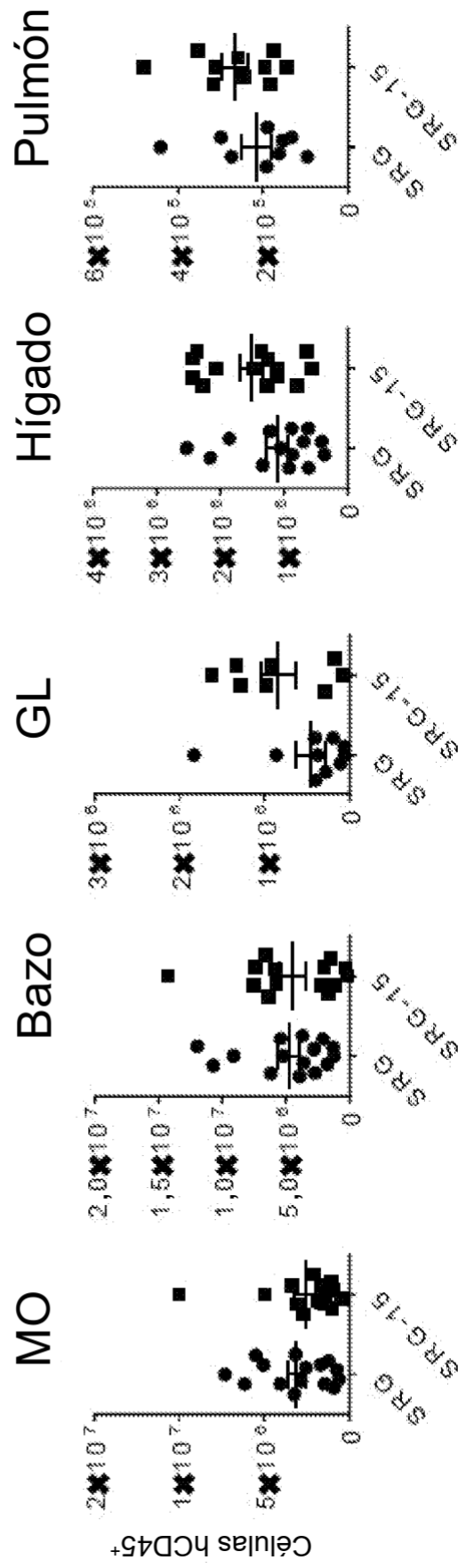


FIG. 6A

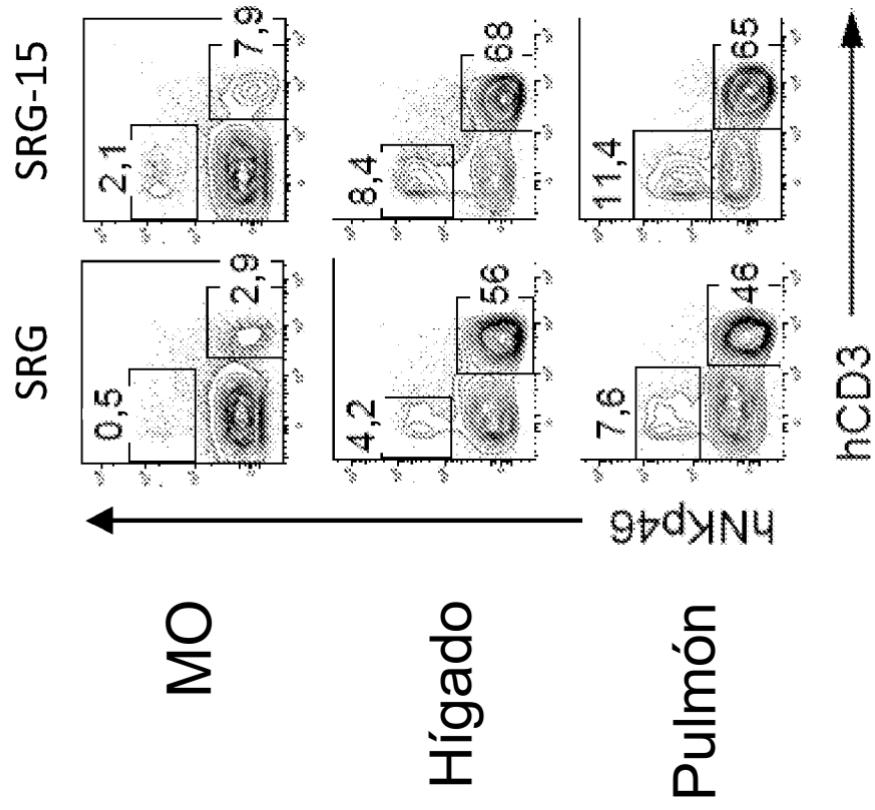


FIG. 6B

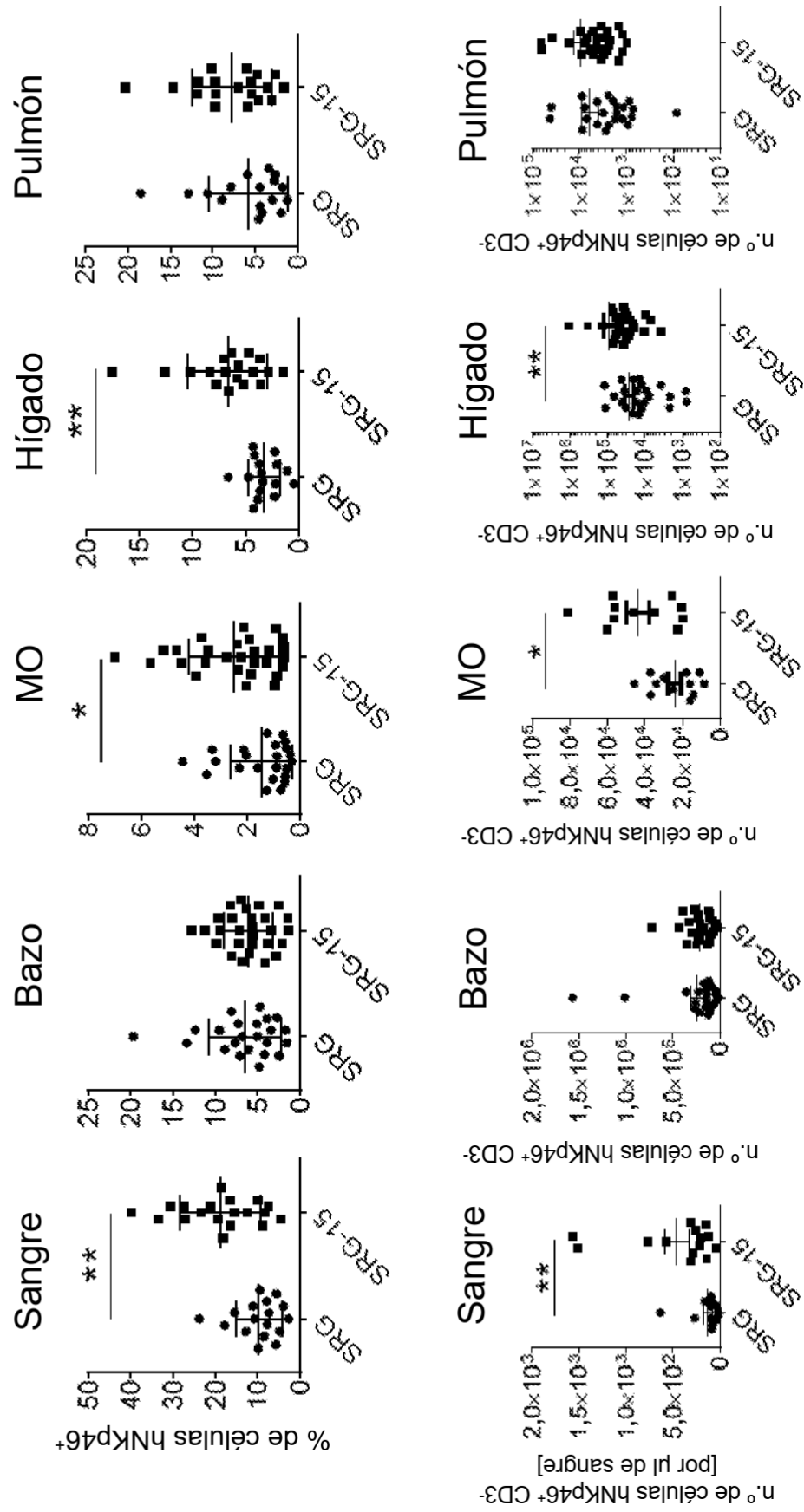


FIG. 6C

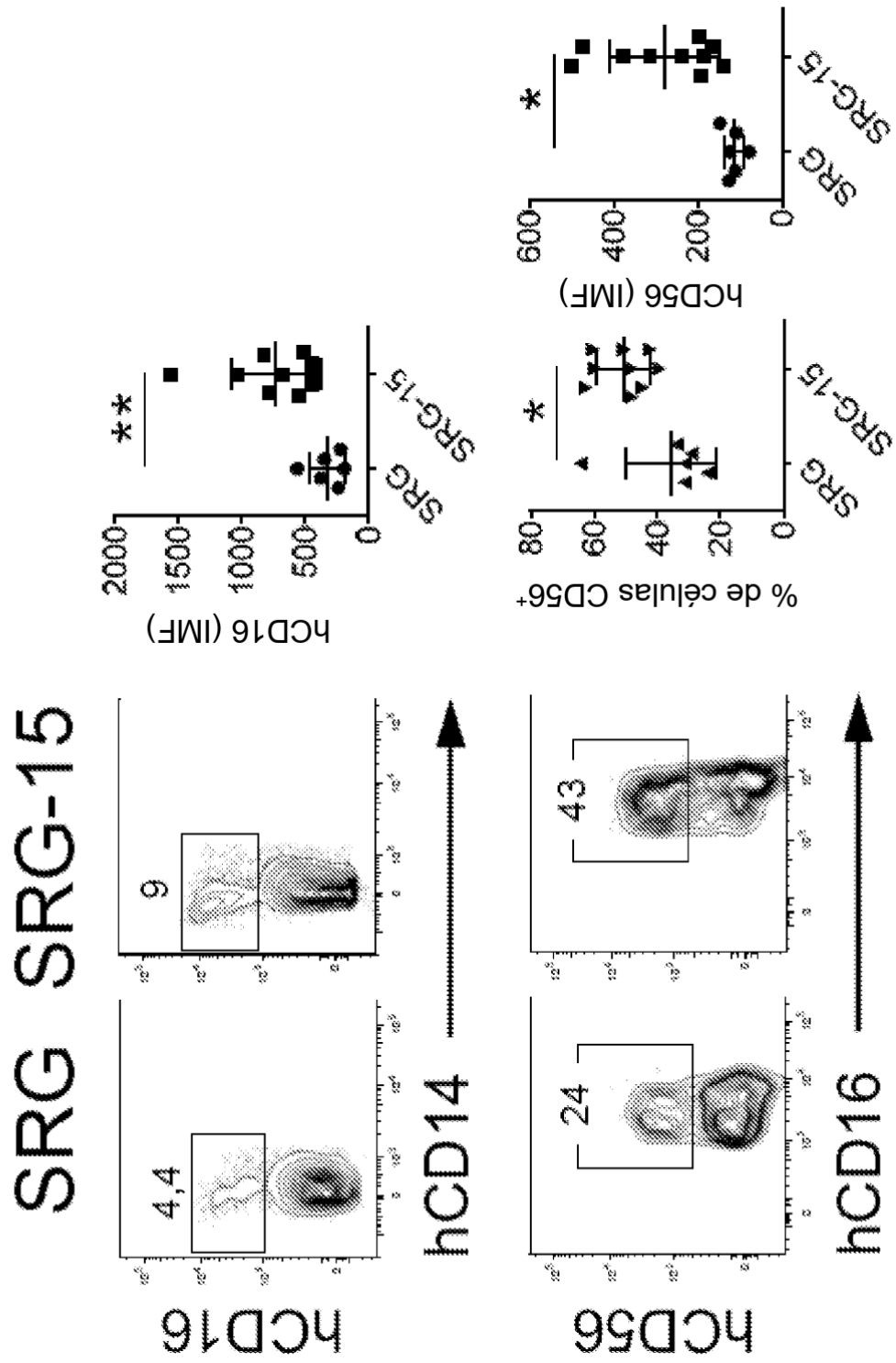
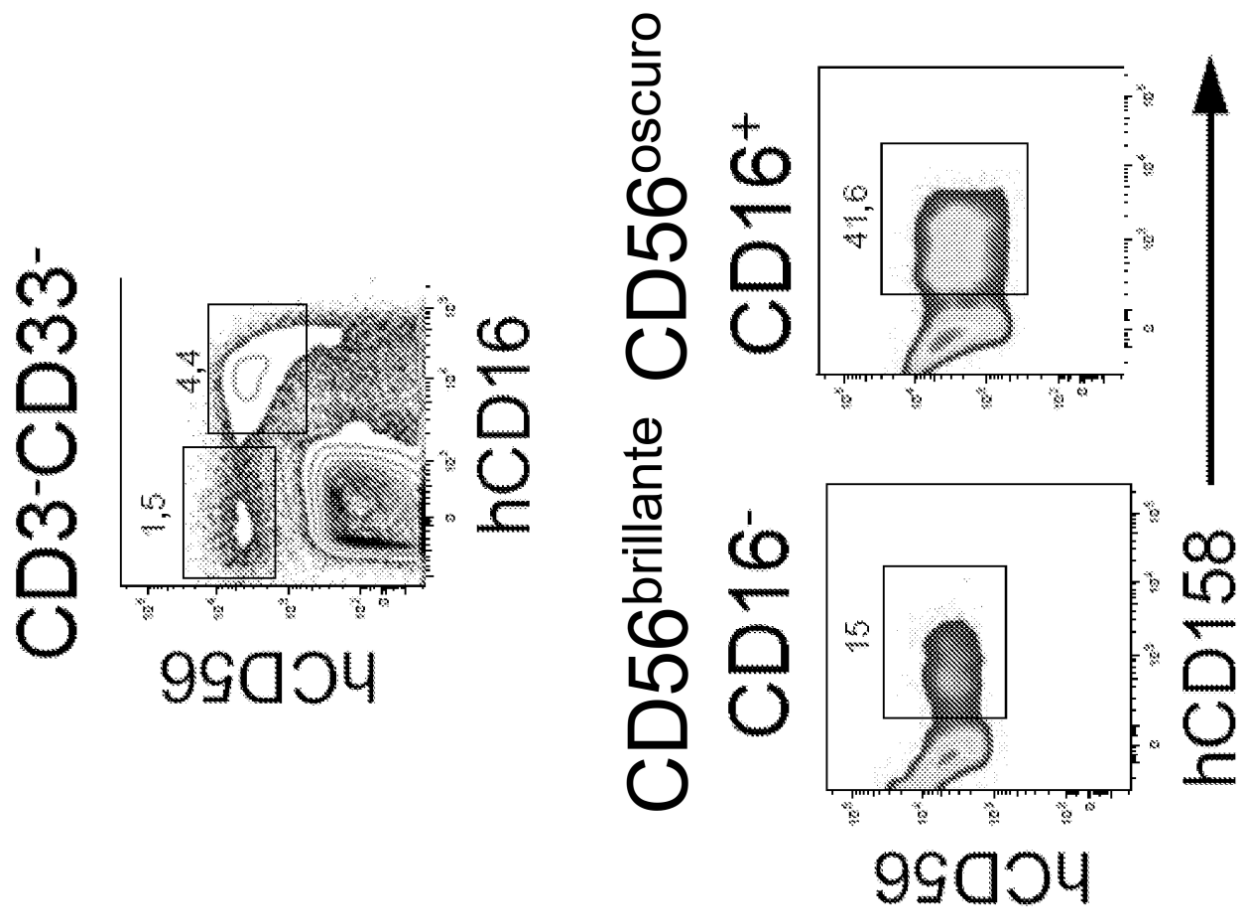


FIG. 6D



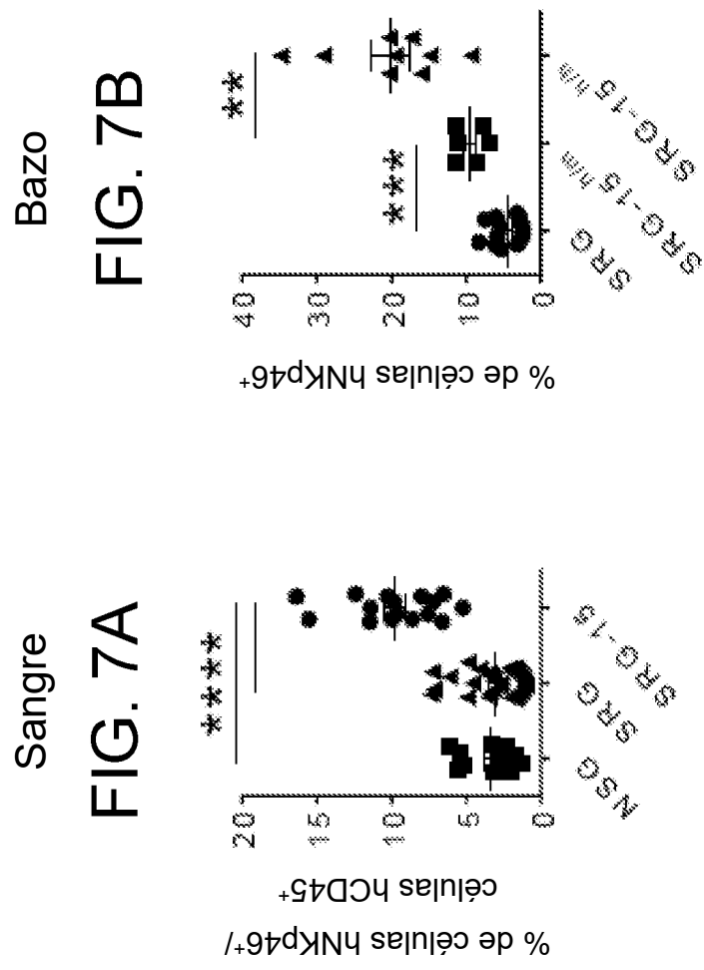


FIG. 7C

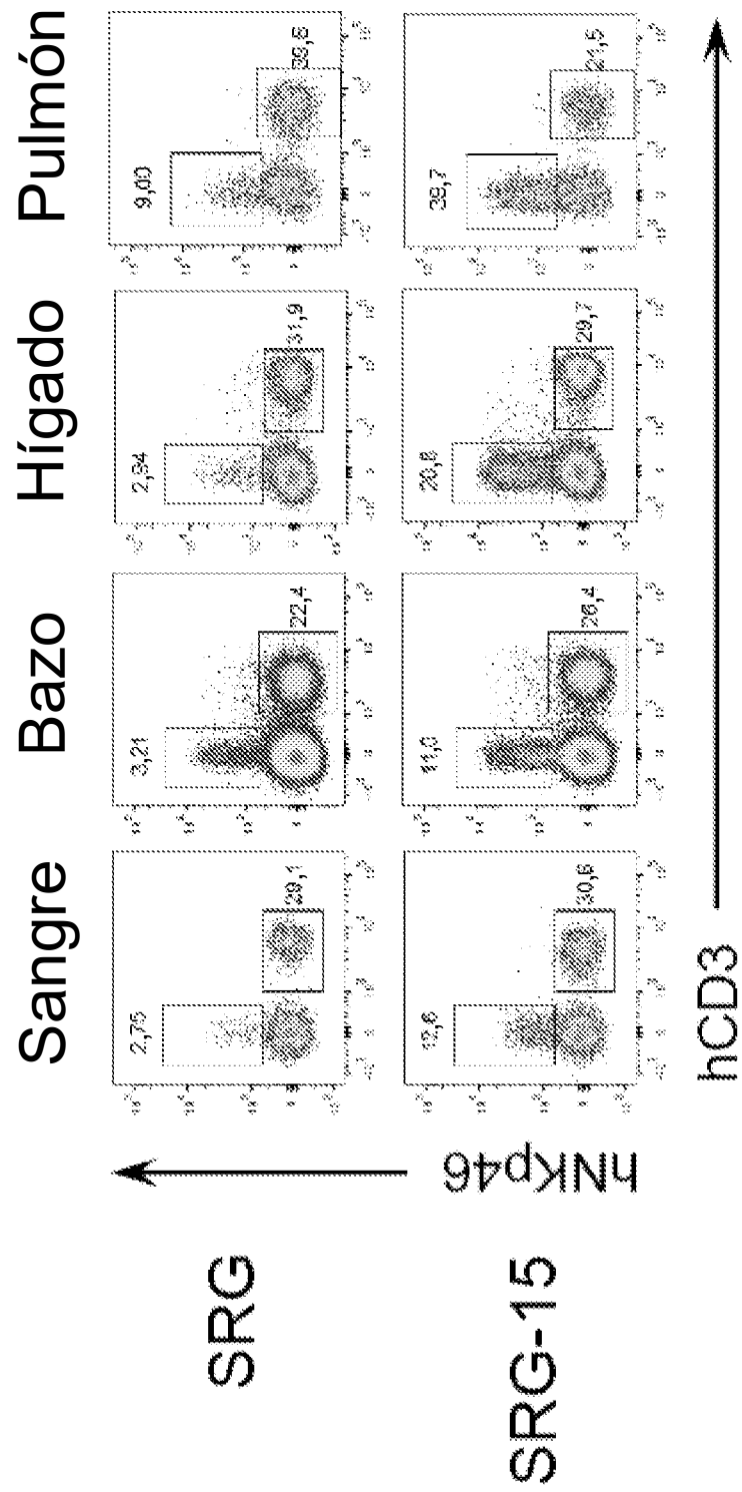
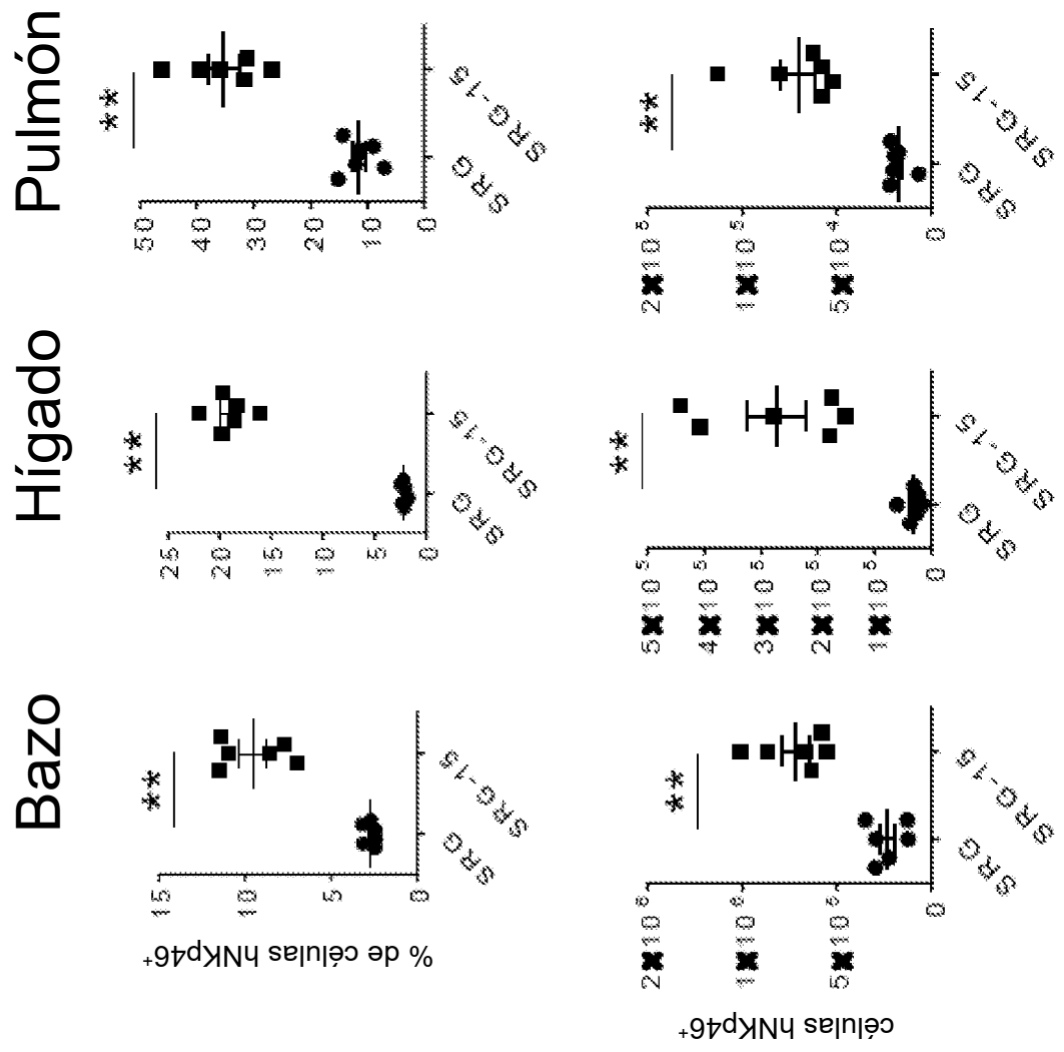


FIG. 7D



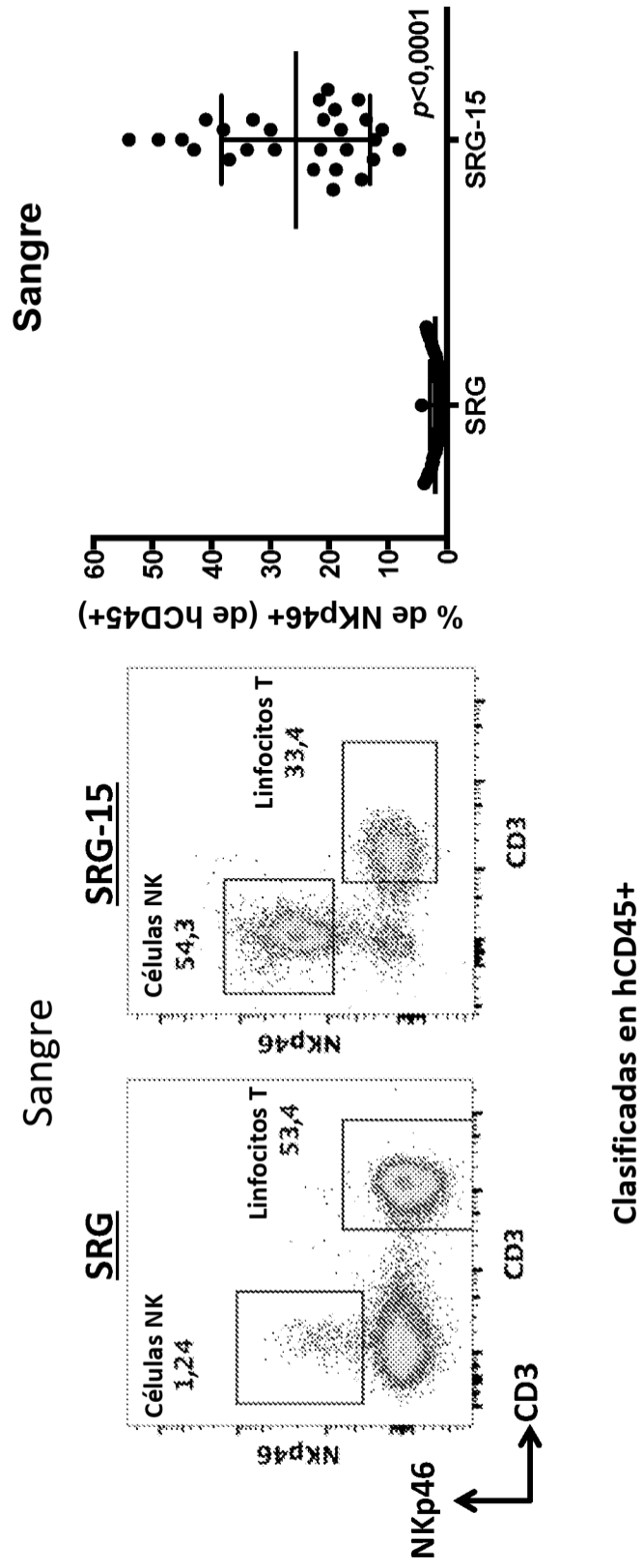
$$\frac{\infty}{F|G}$$


FIG. 9A

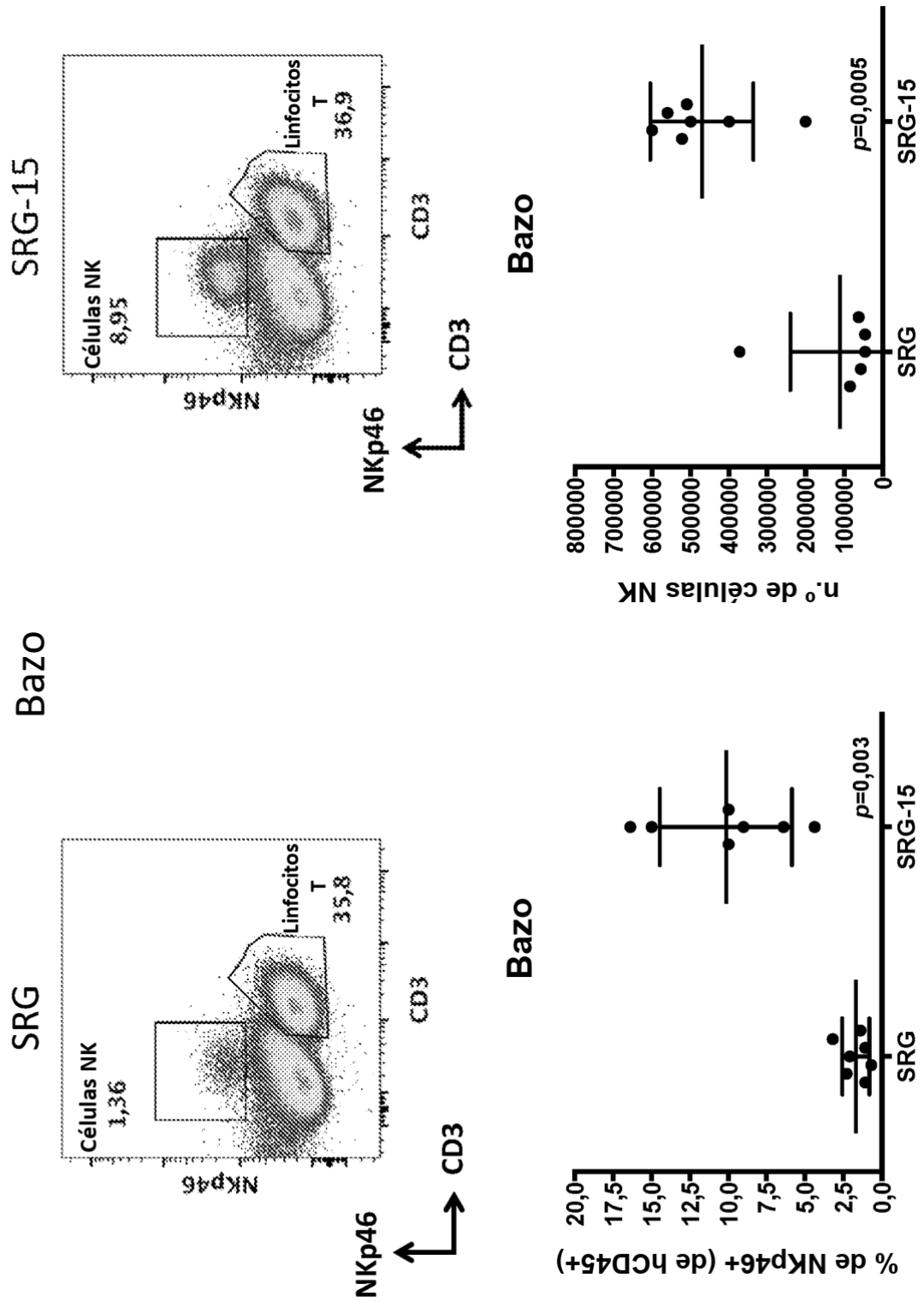


FIG. 9B

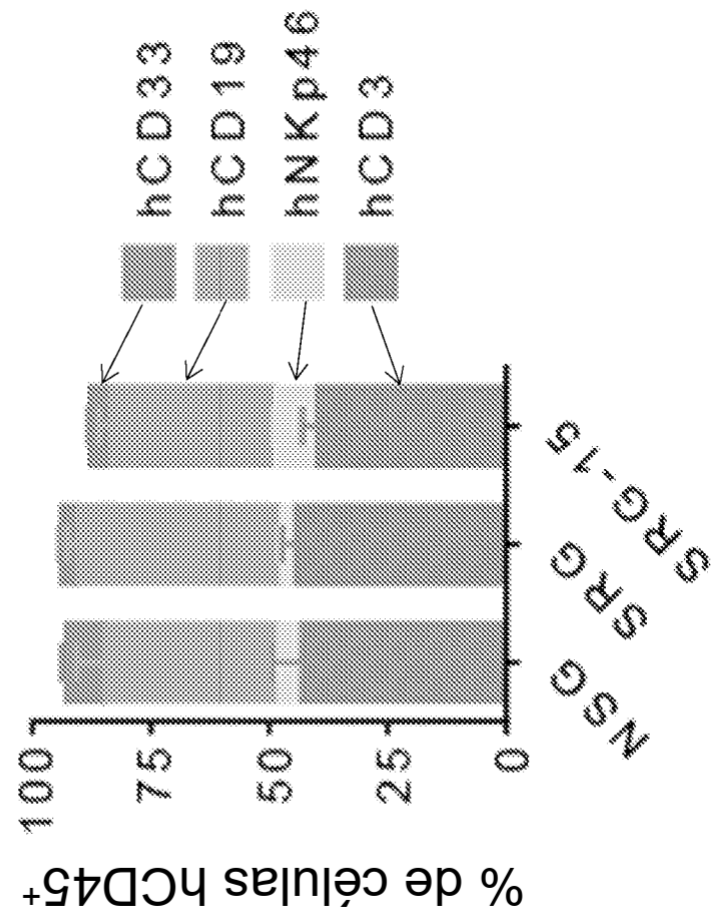


FIG. 9C

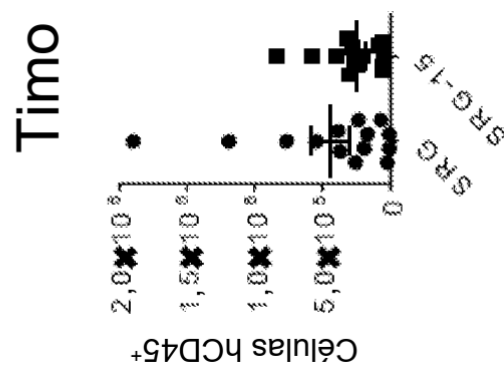


FIG. 9D

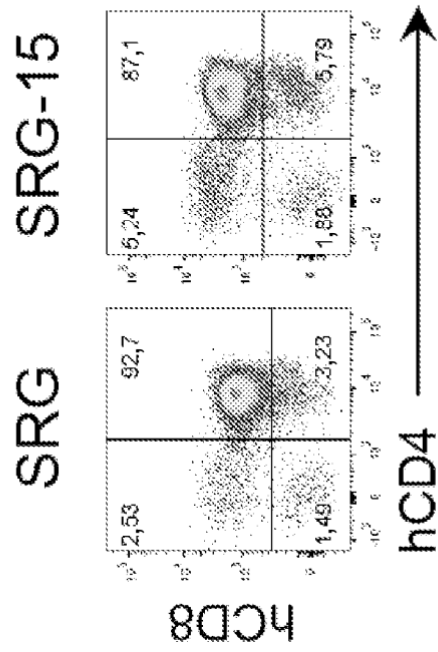


FIG. 9E

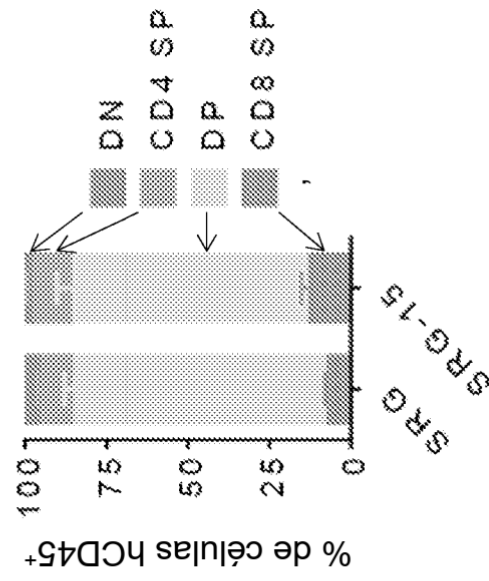


FIG. 10A

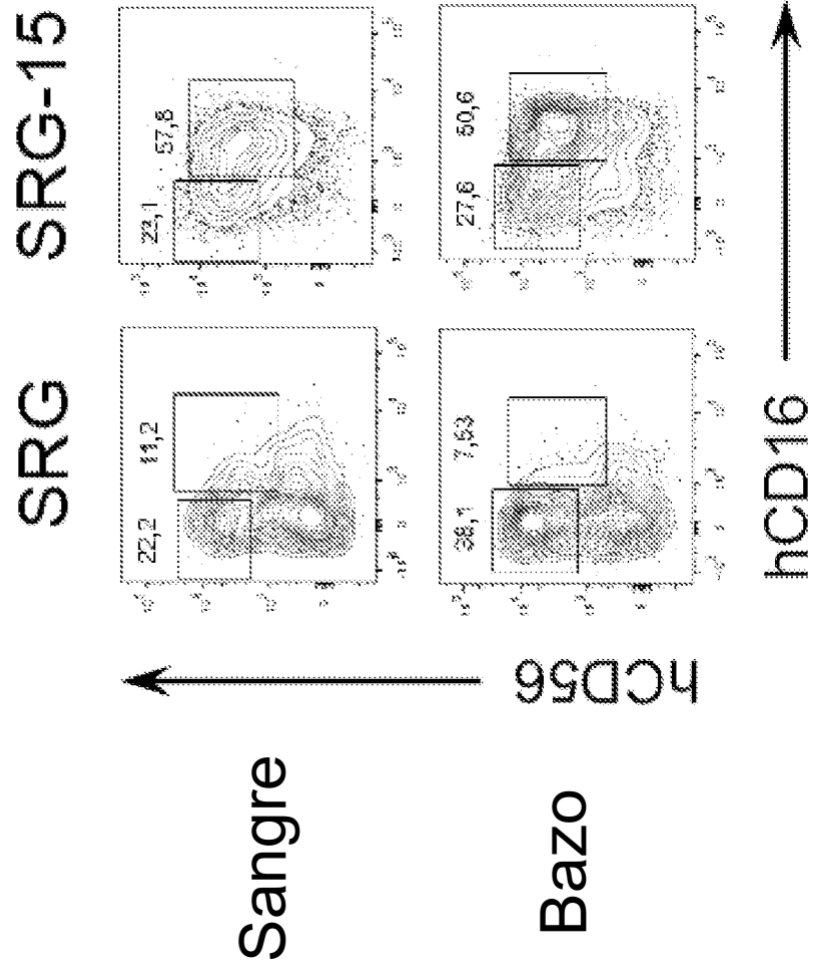
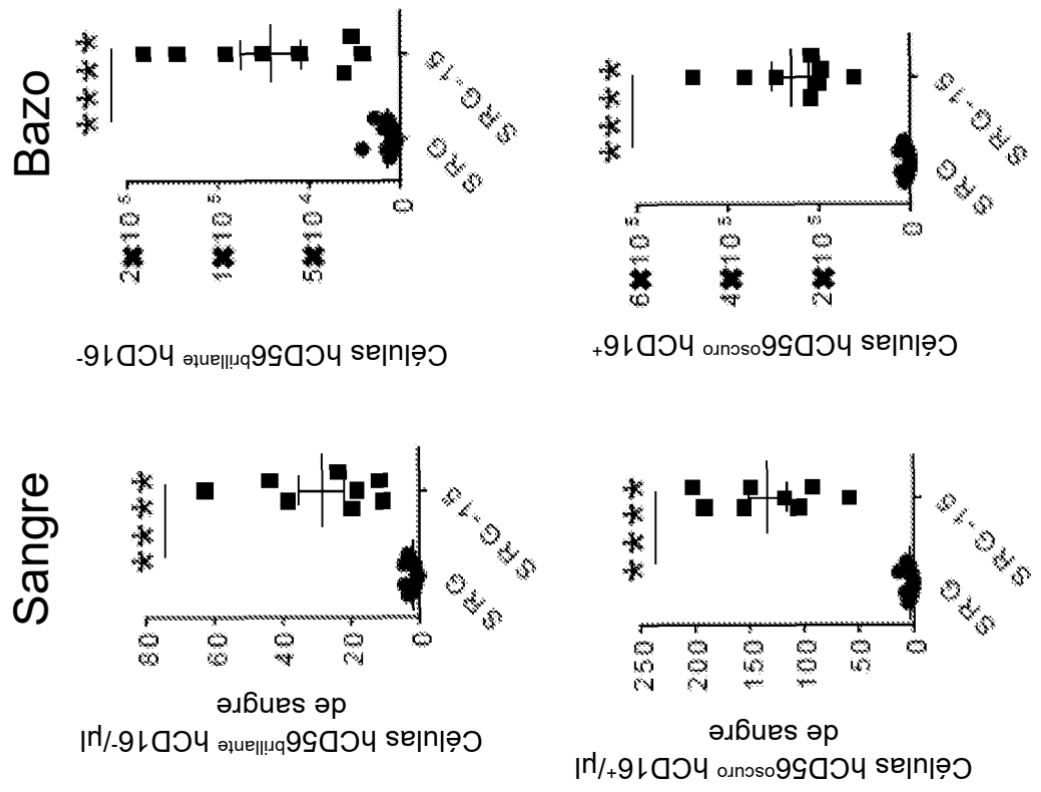


FIG. 10B



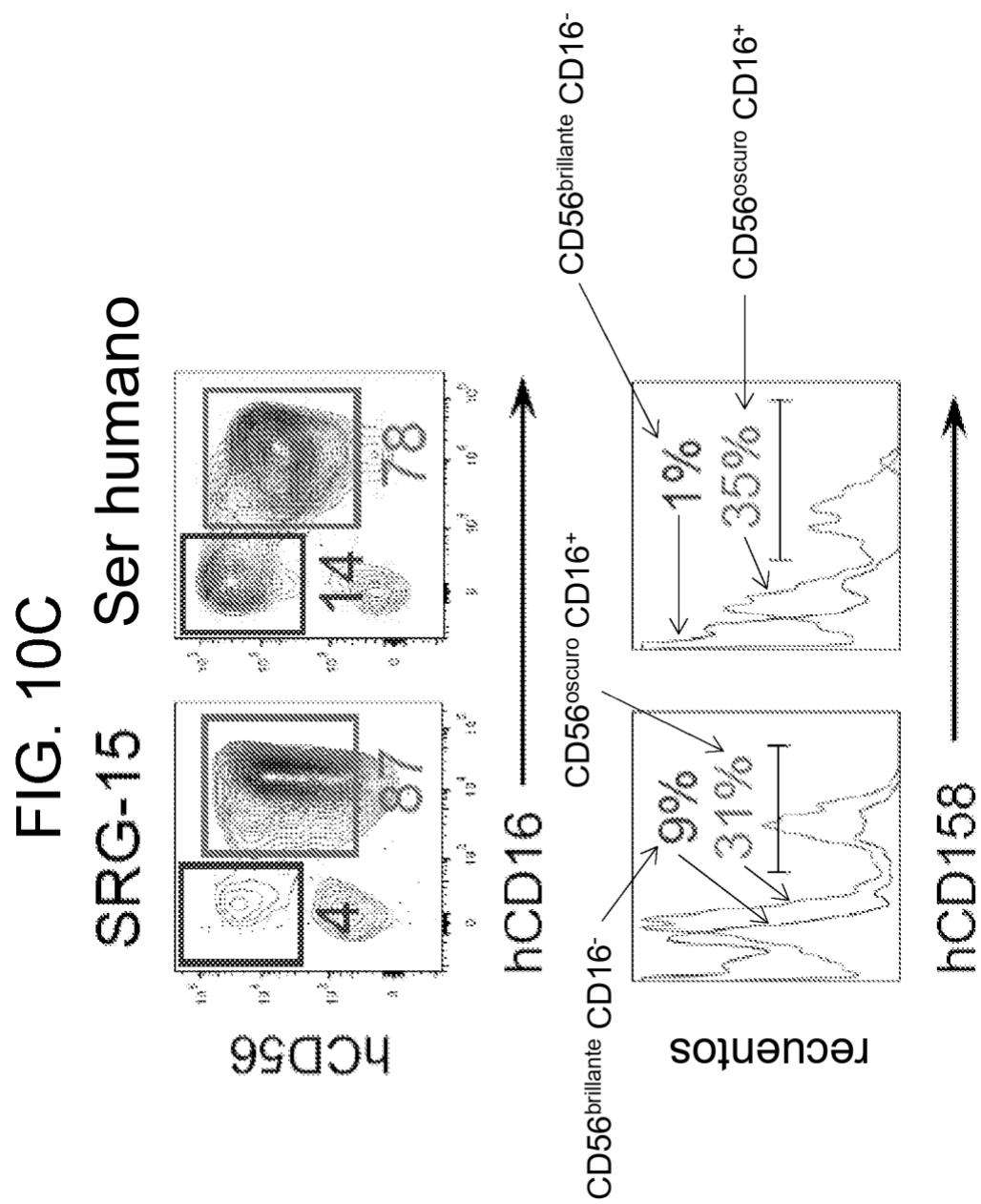


FIG. 11

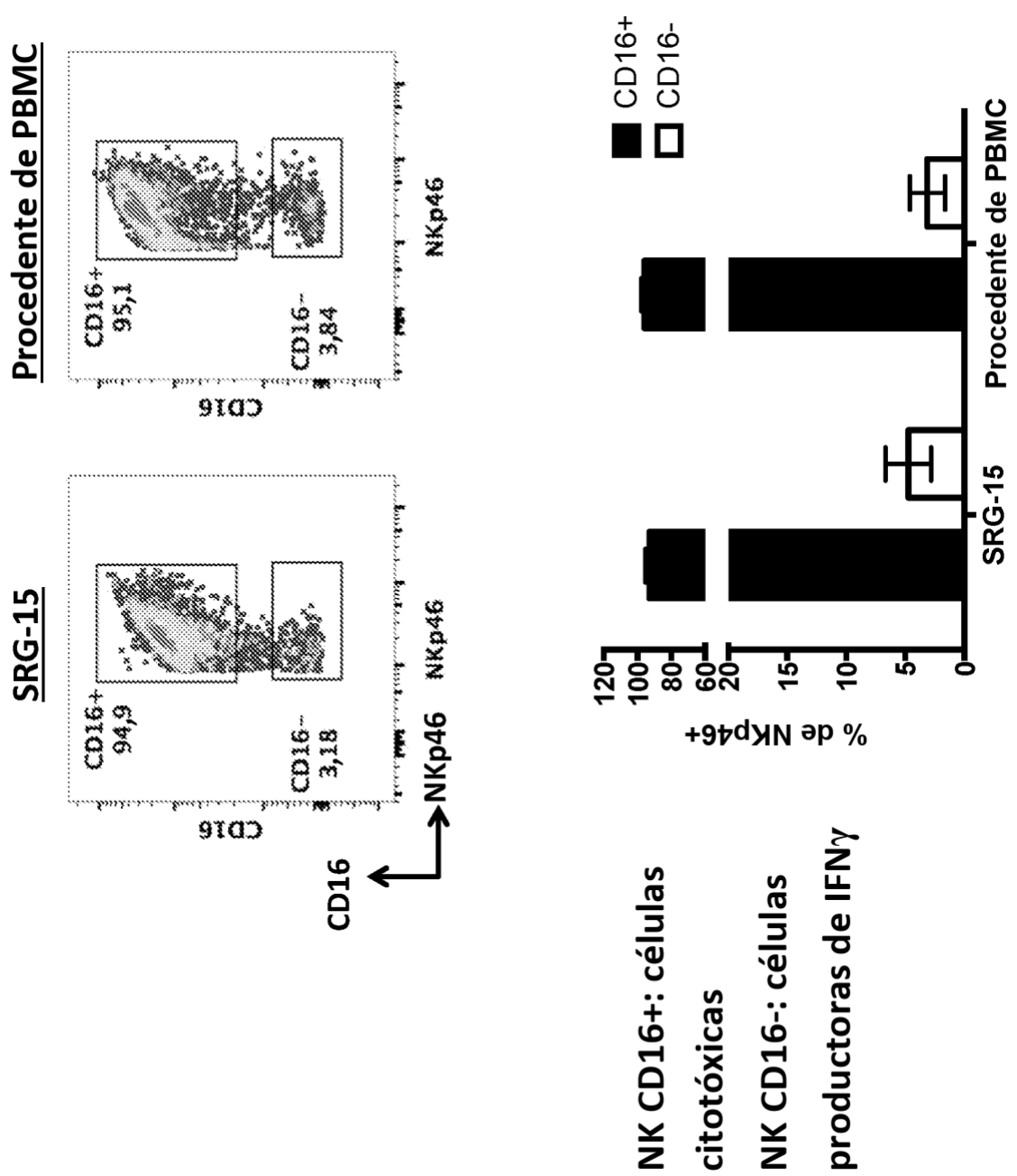


FIG. 12

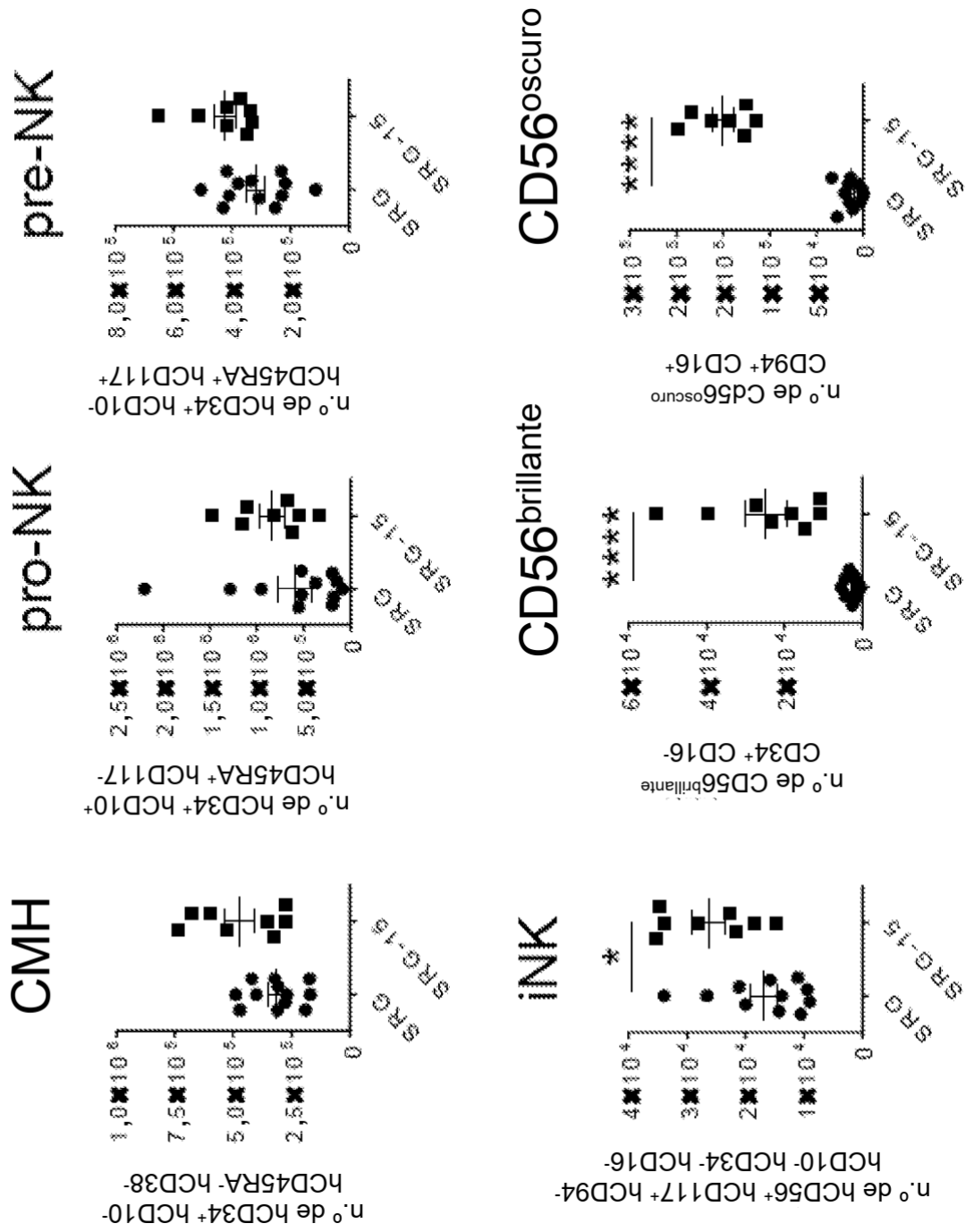


FIG. 13A

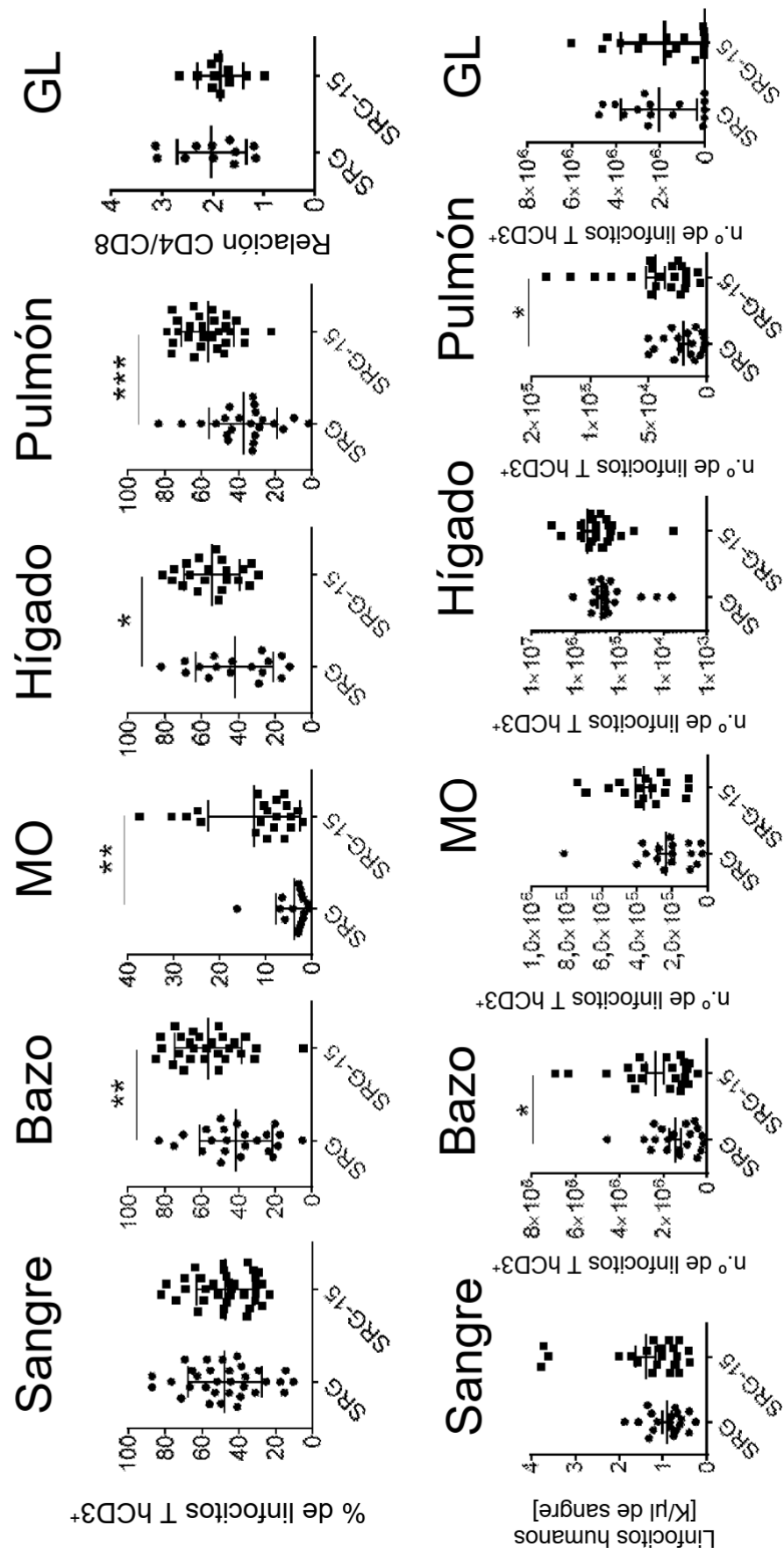


FIG. 13B

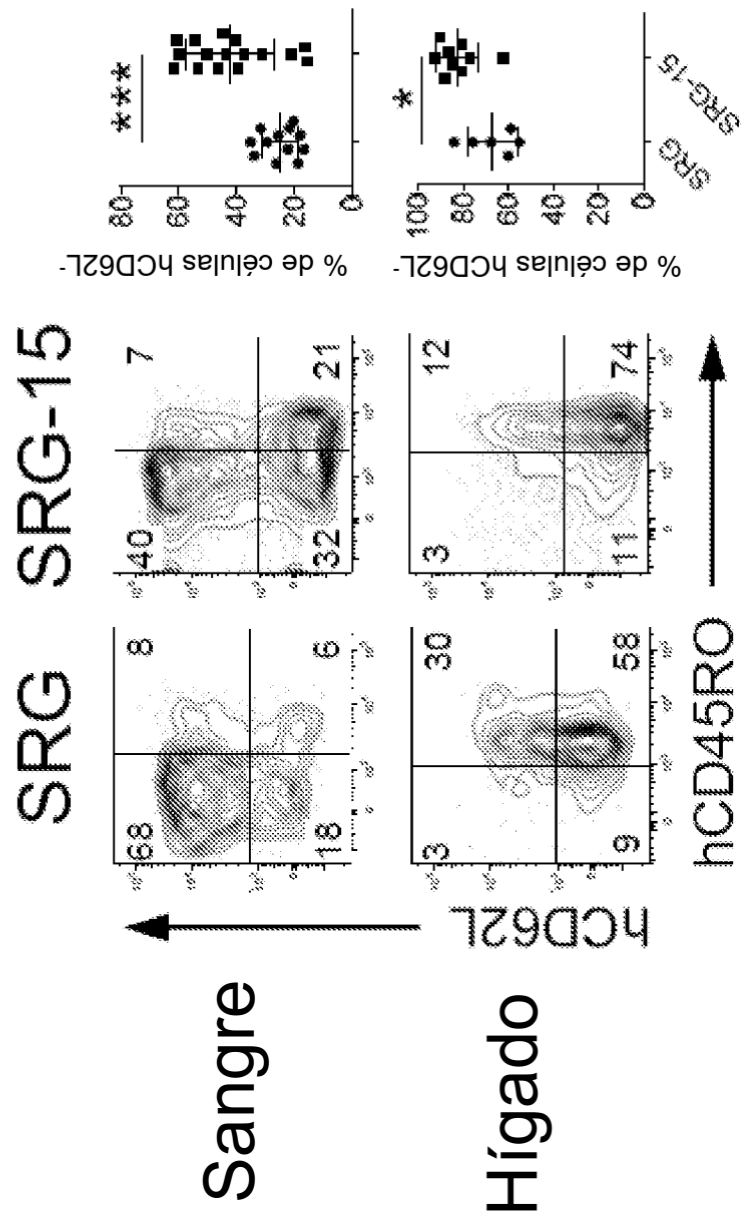


FIG. 14A

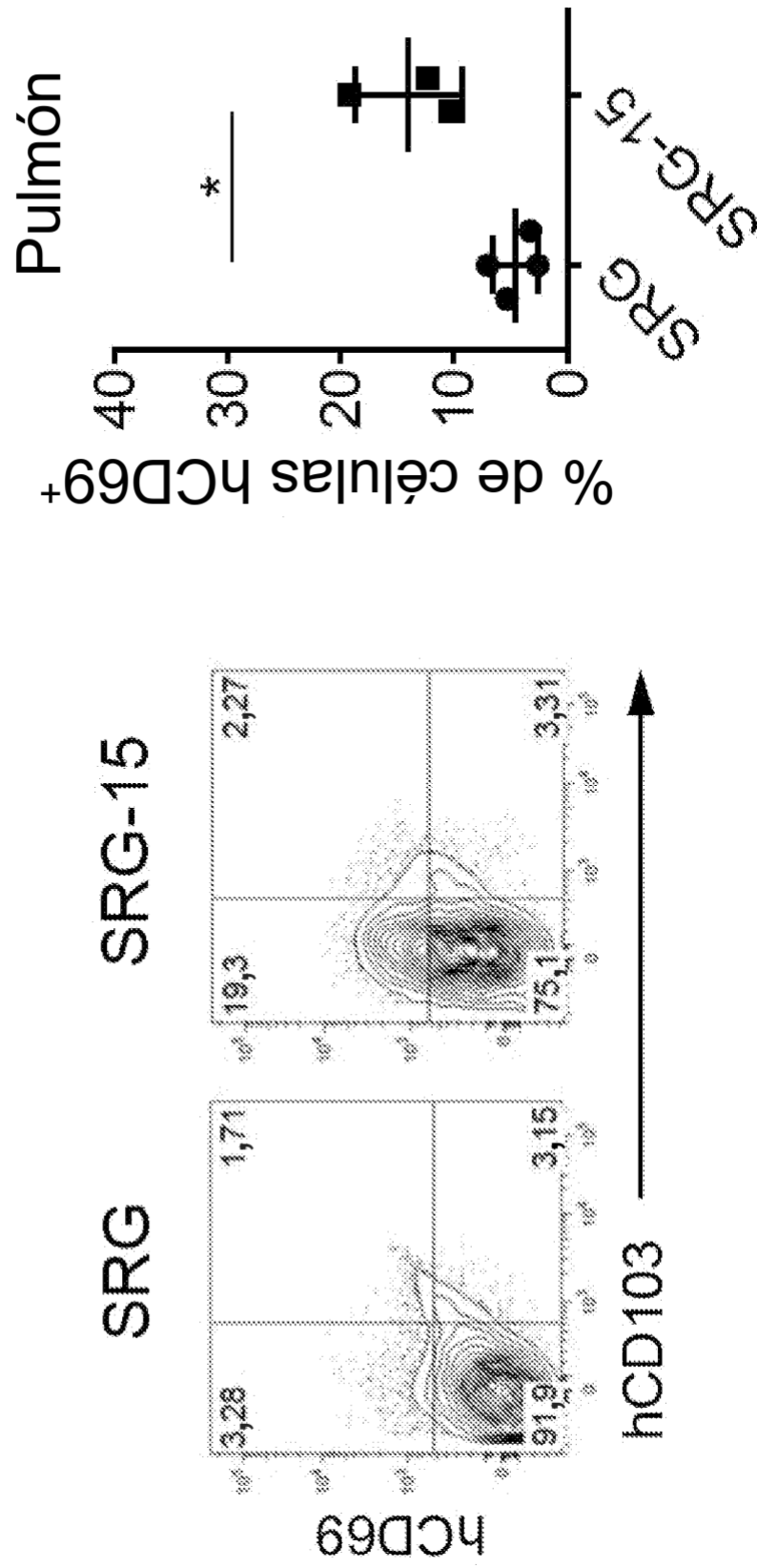


FIG. 14B

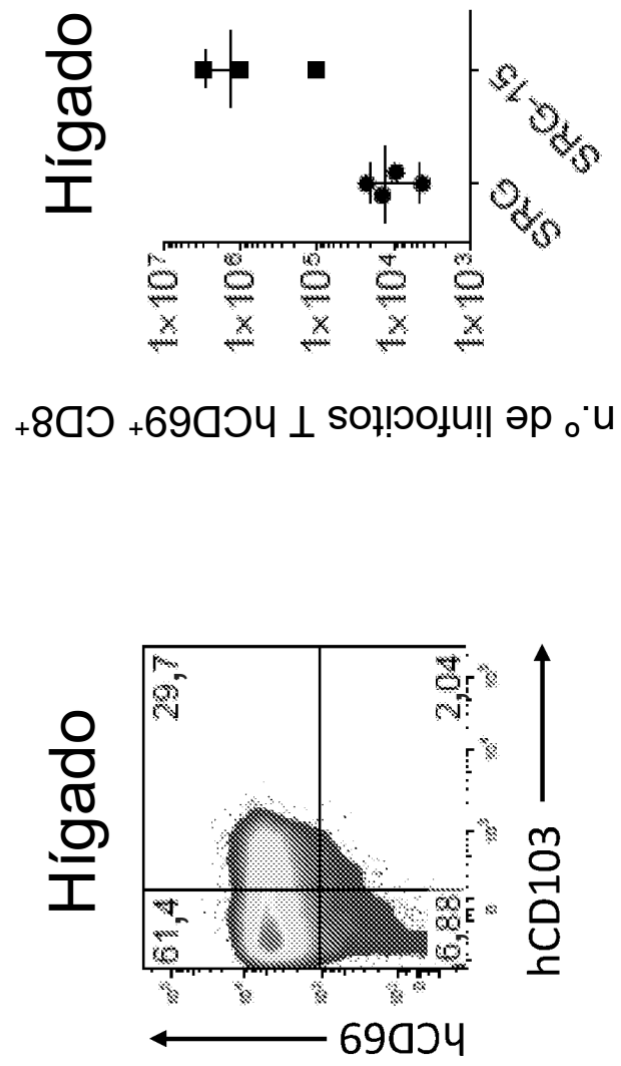


FIG. 15A

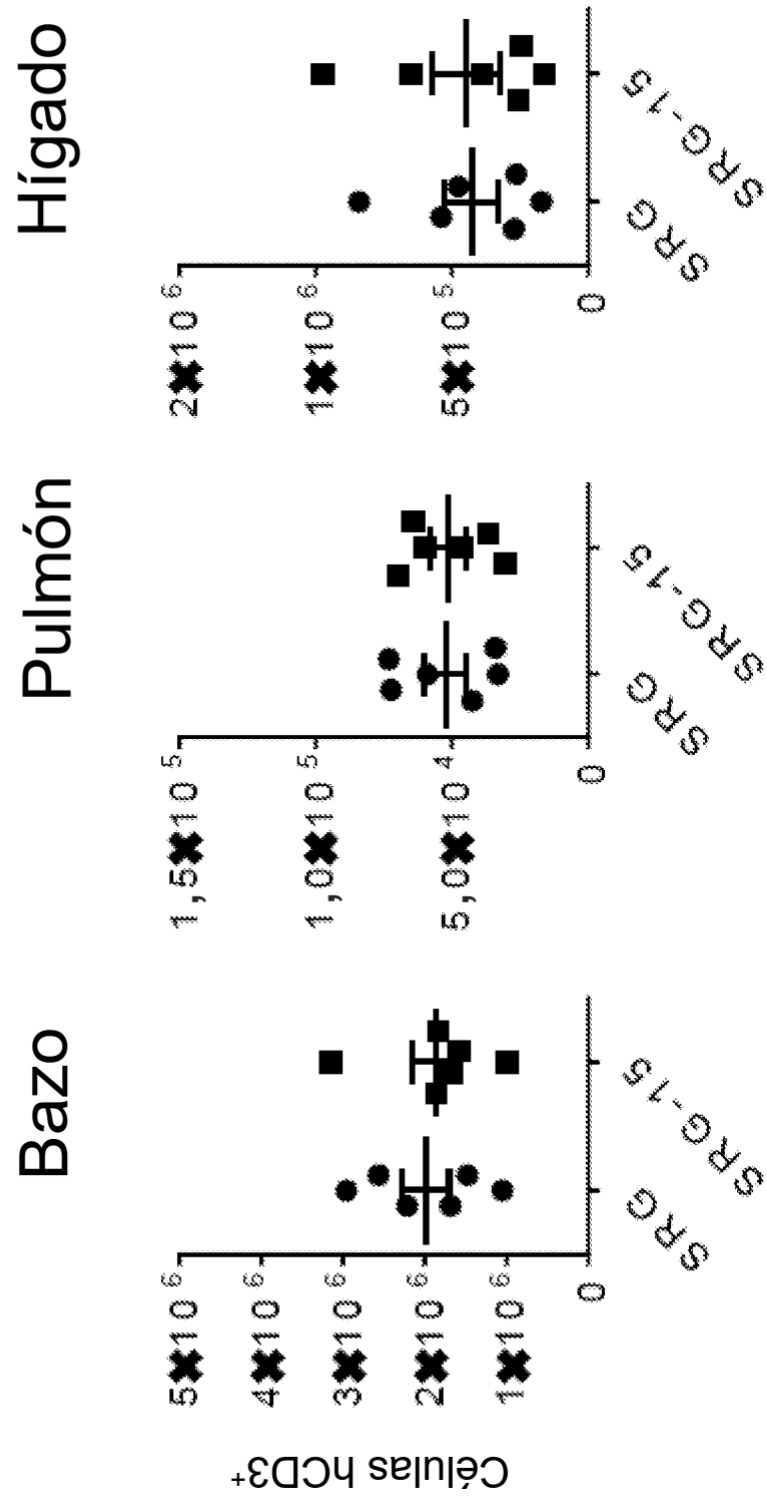
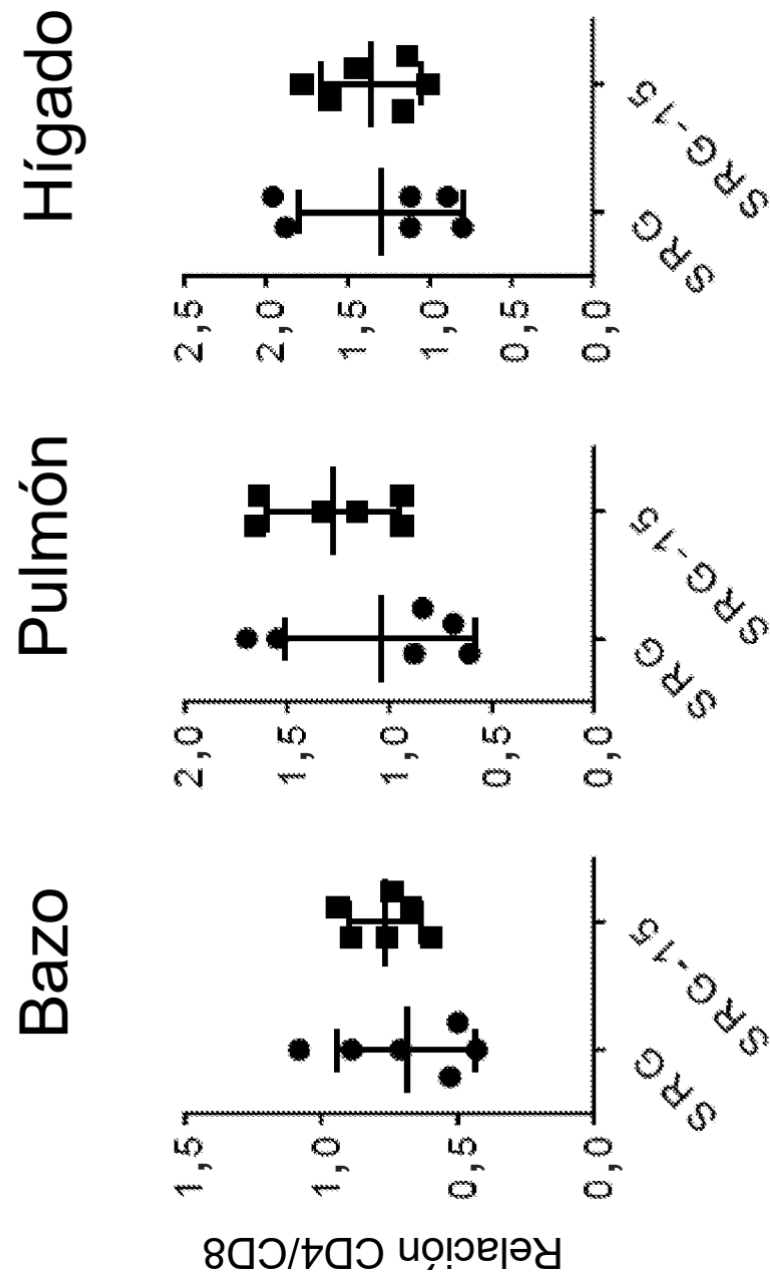


FIG. 15B



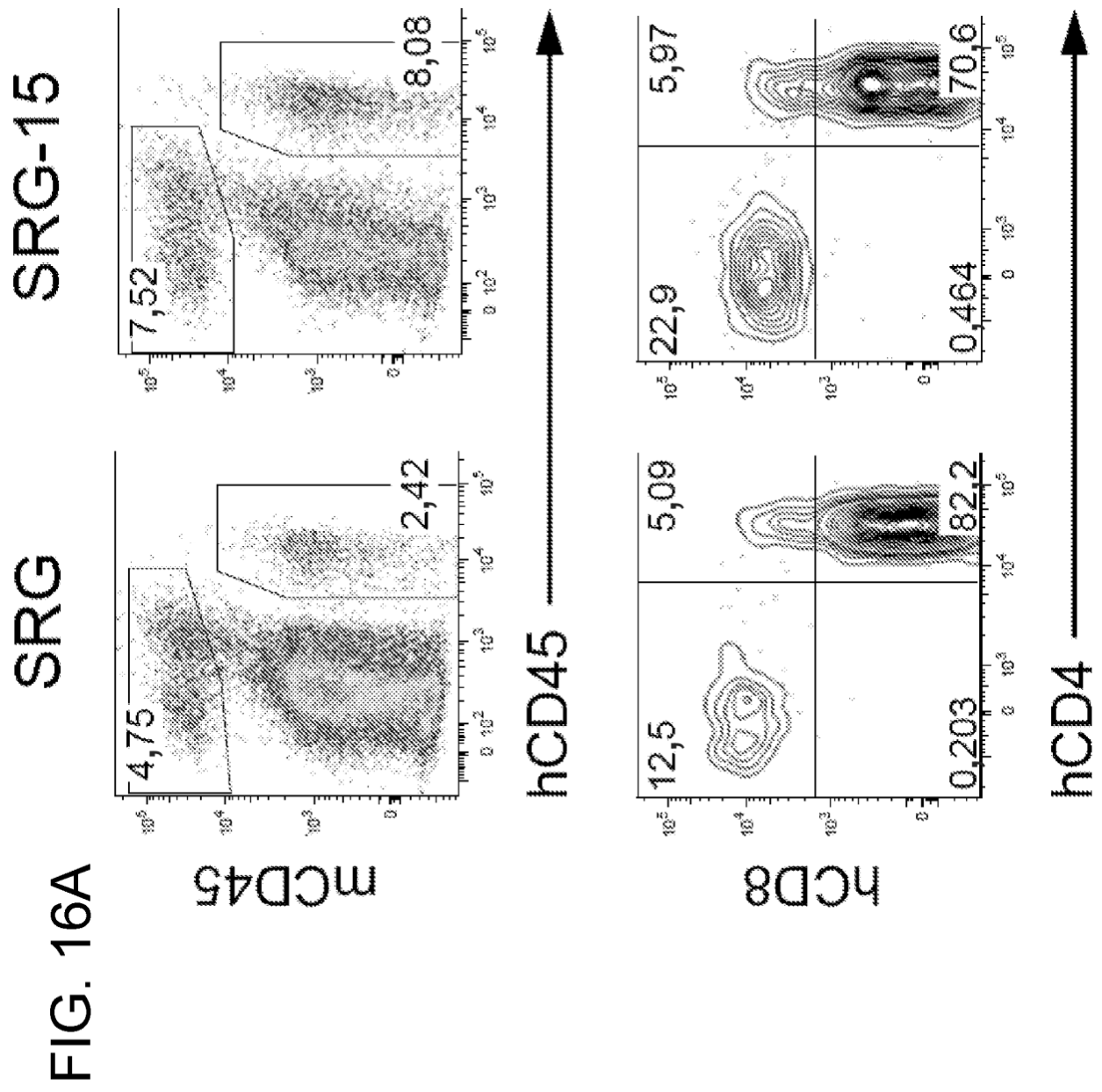


FIG. 16B

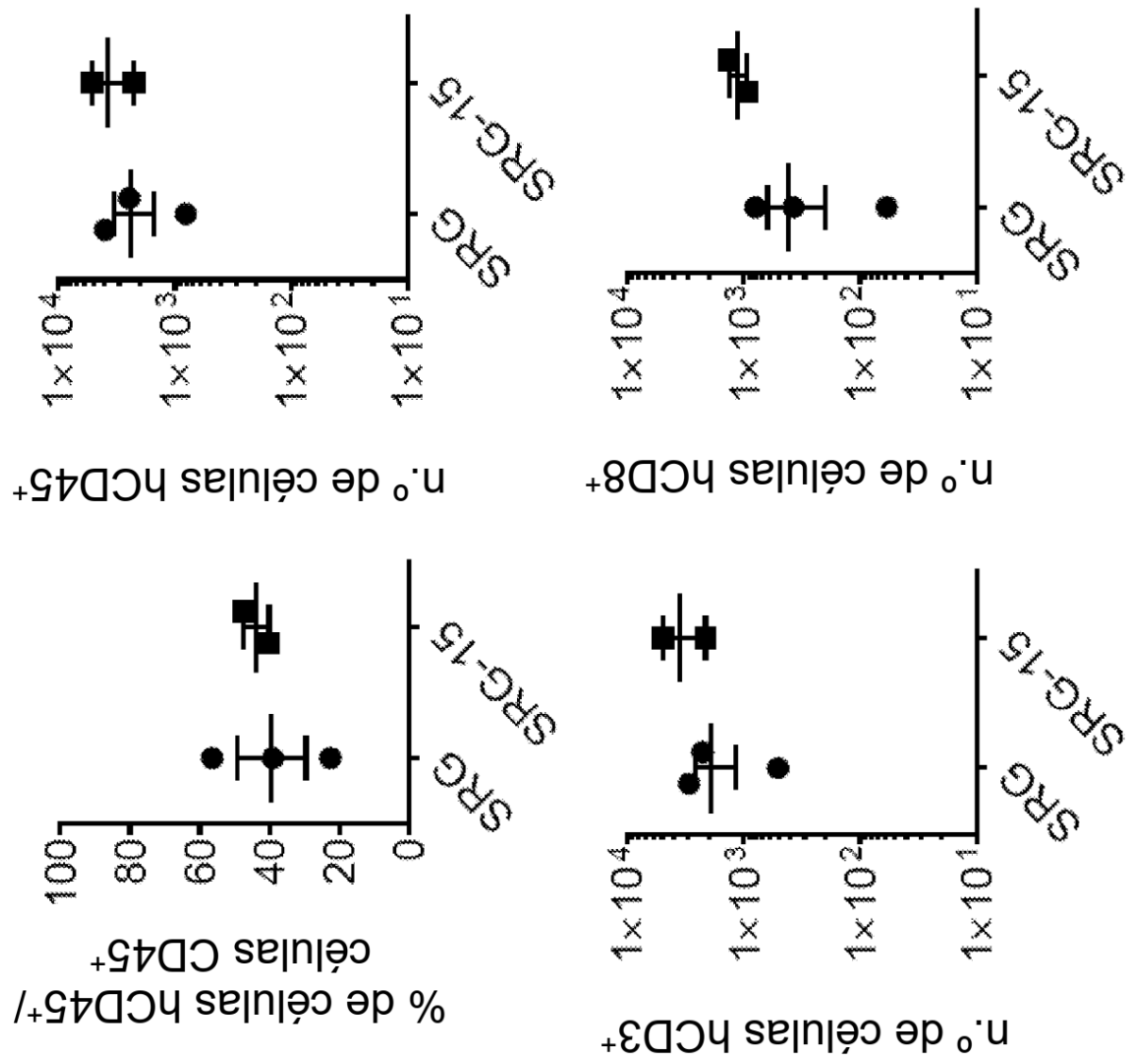


FIG. 17A

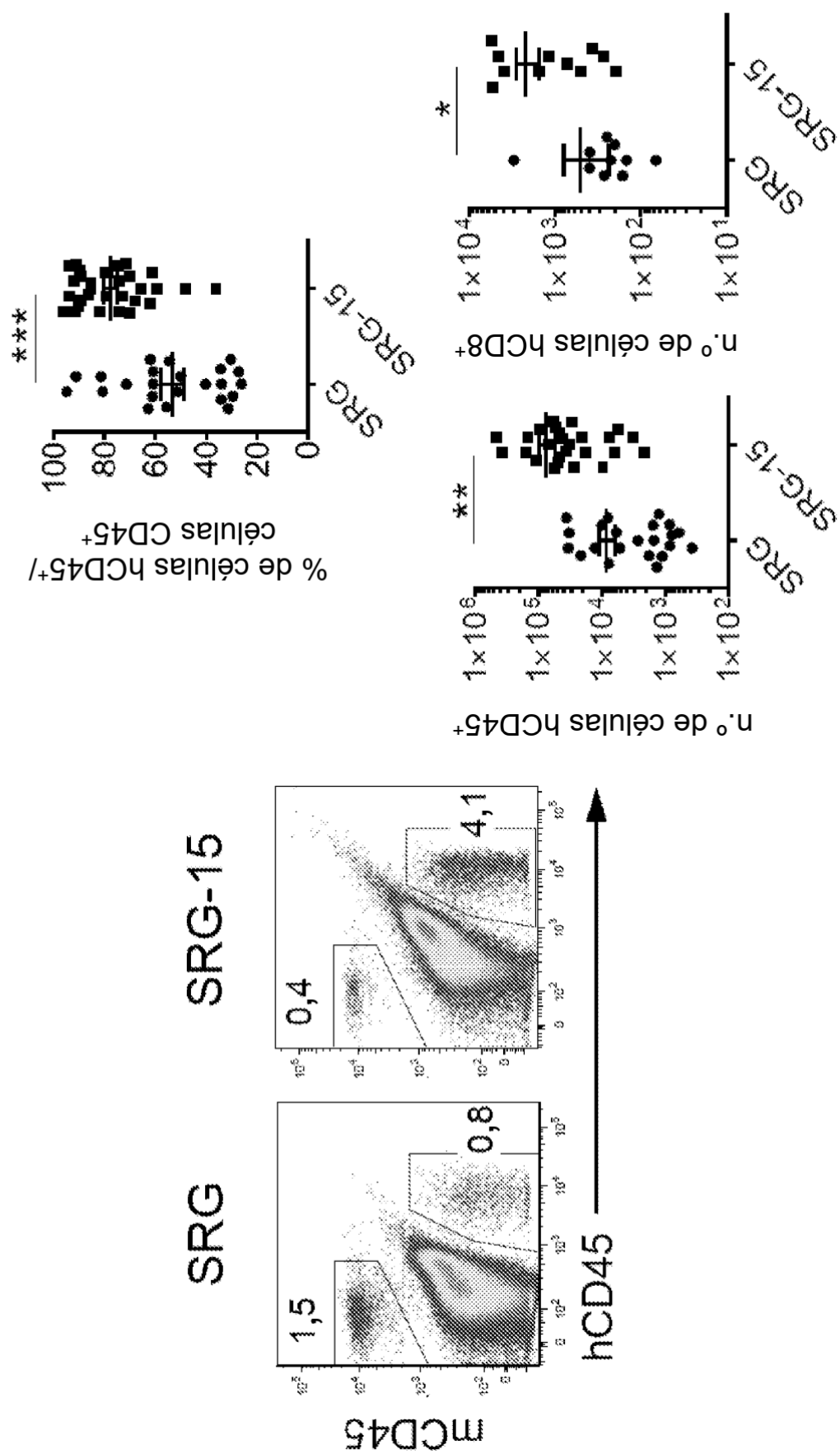
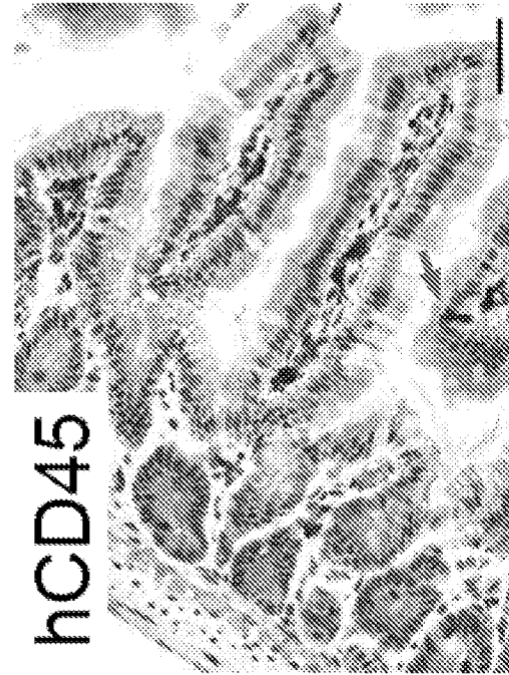


FIG. 17B

SRG



SRG-15



FIG. 17C

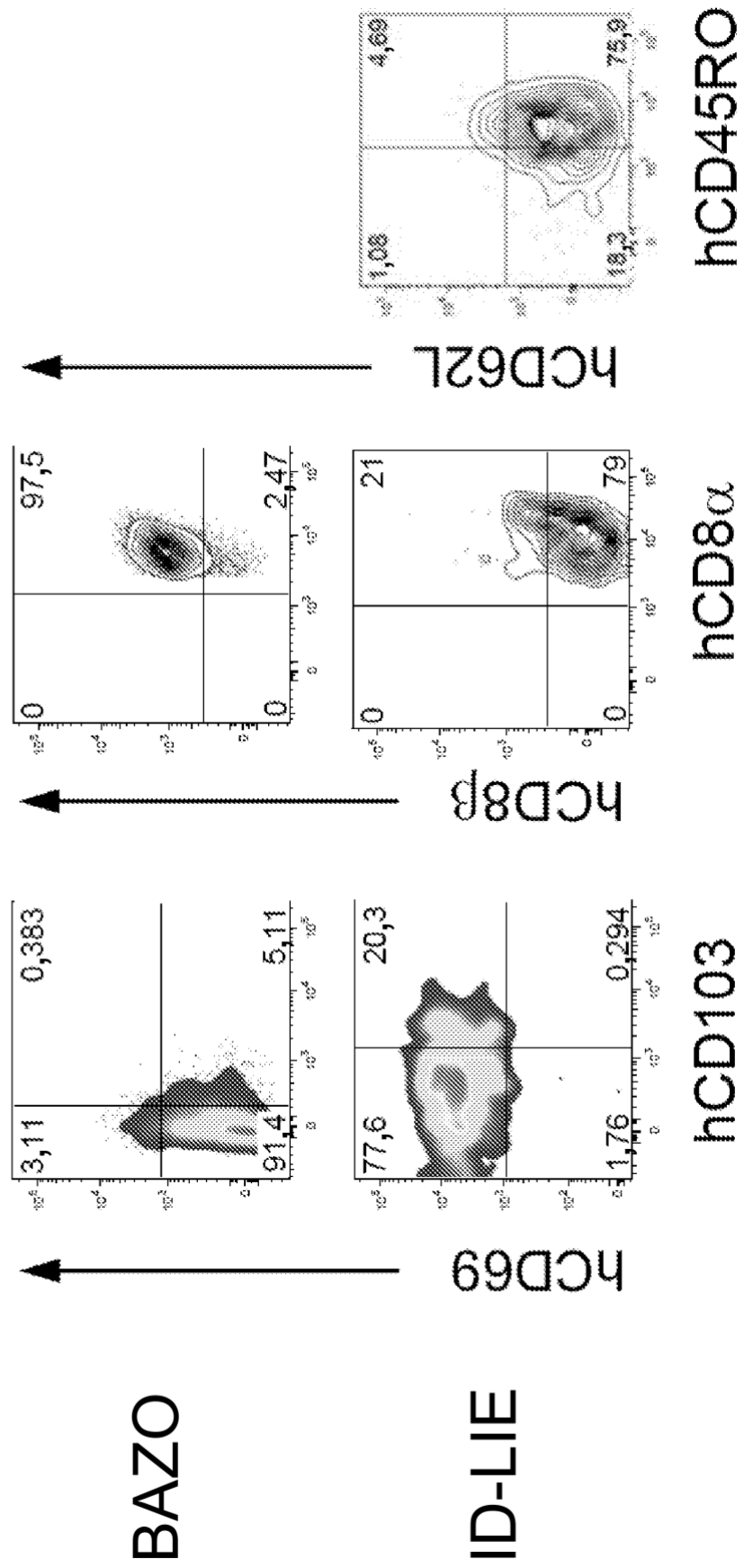


FIG. 18A

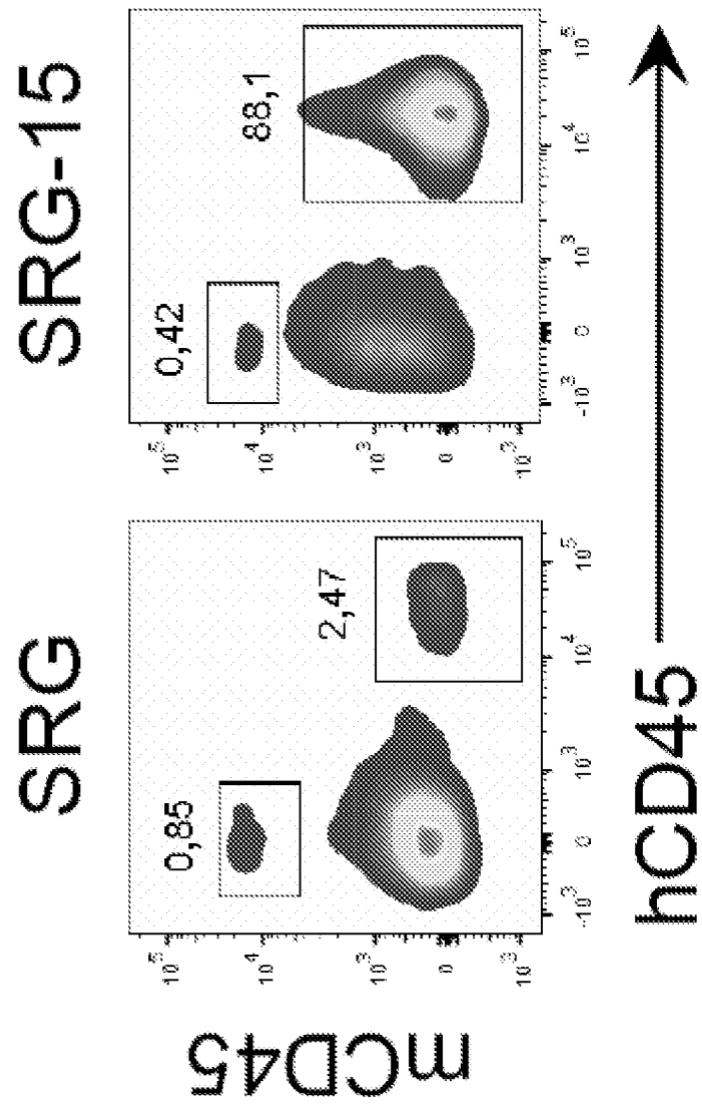


FIG. 18B

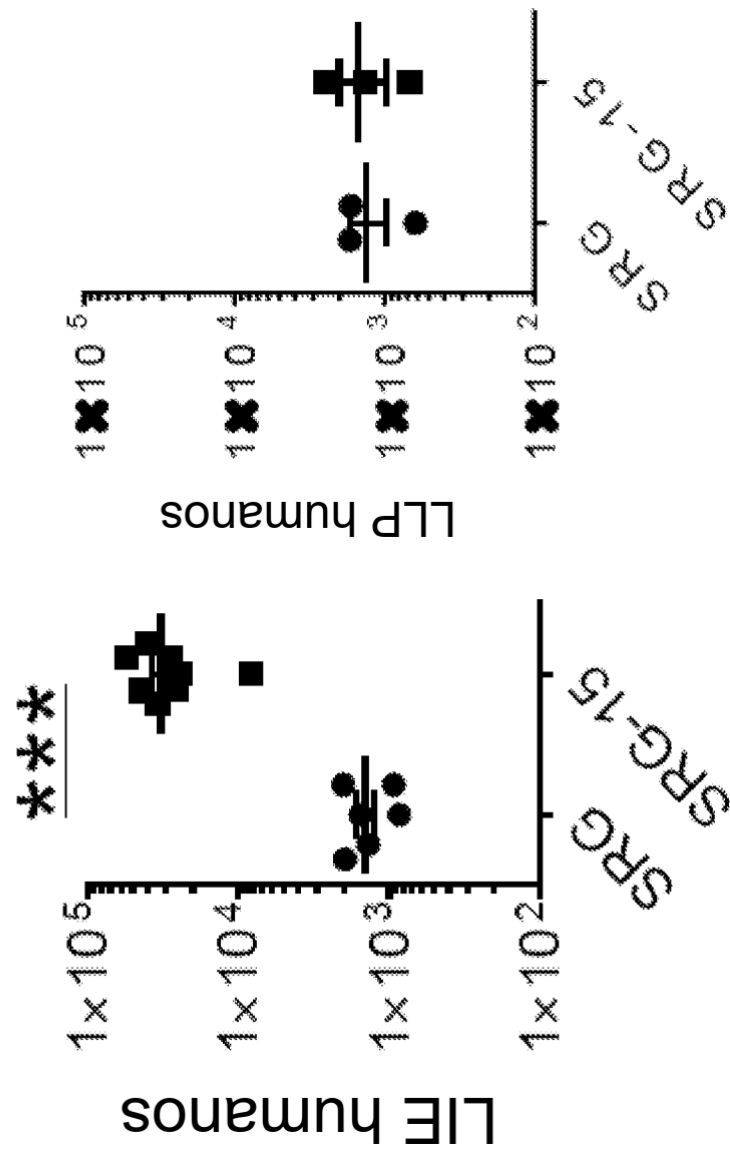


FIG. 18C

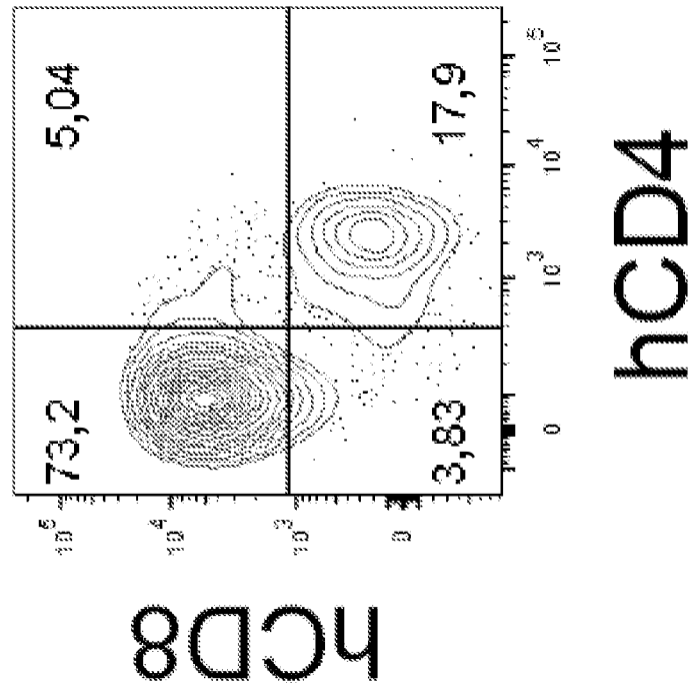


FIG. 18D

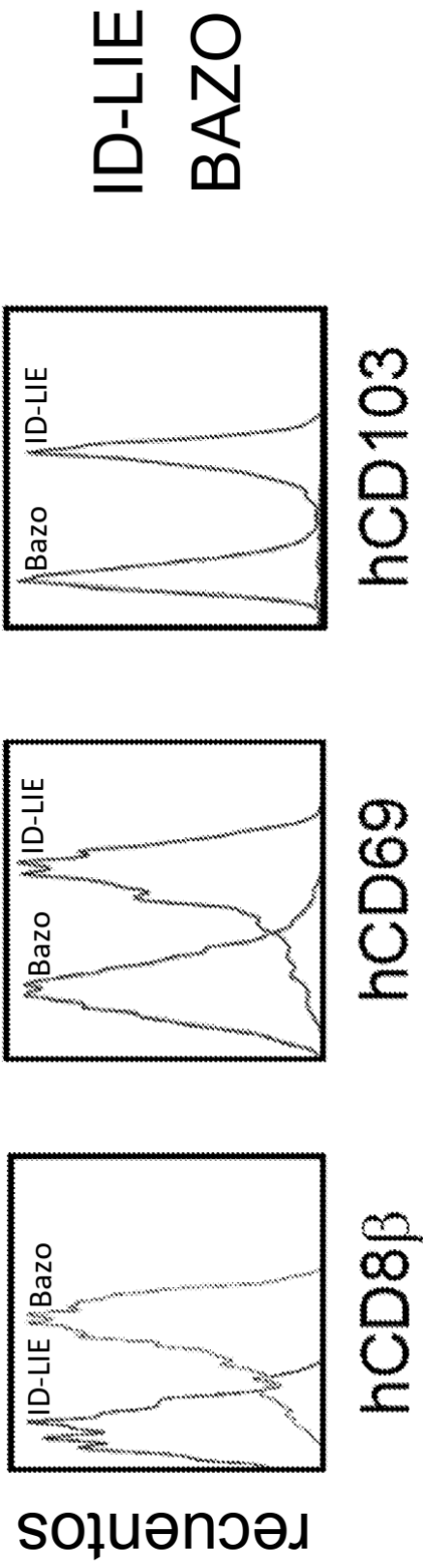


FIG. 18E

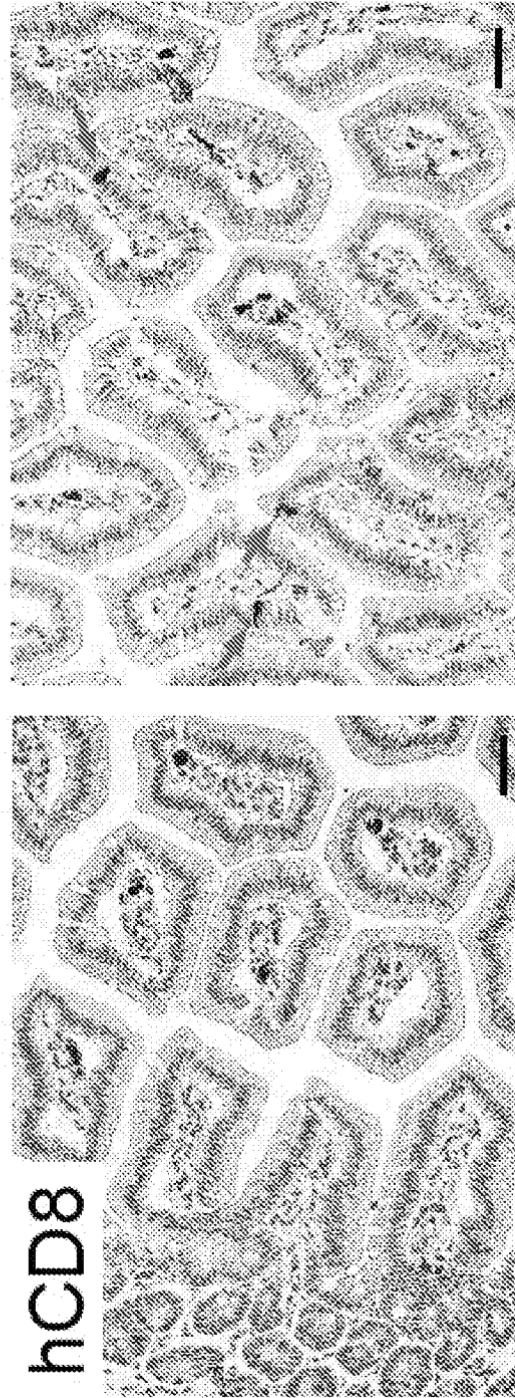


FIG. 19A

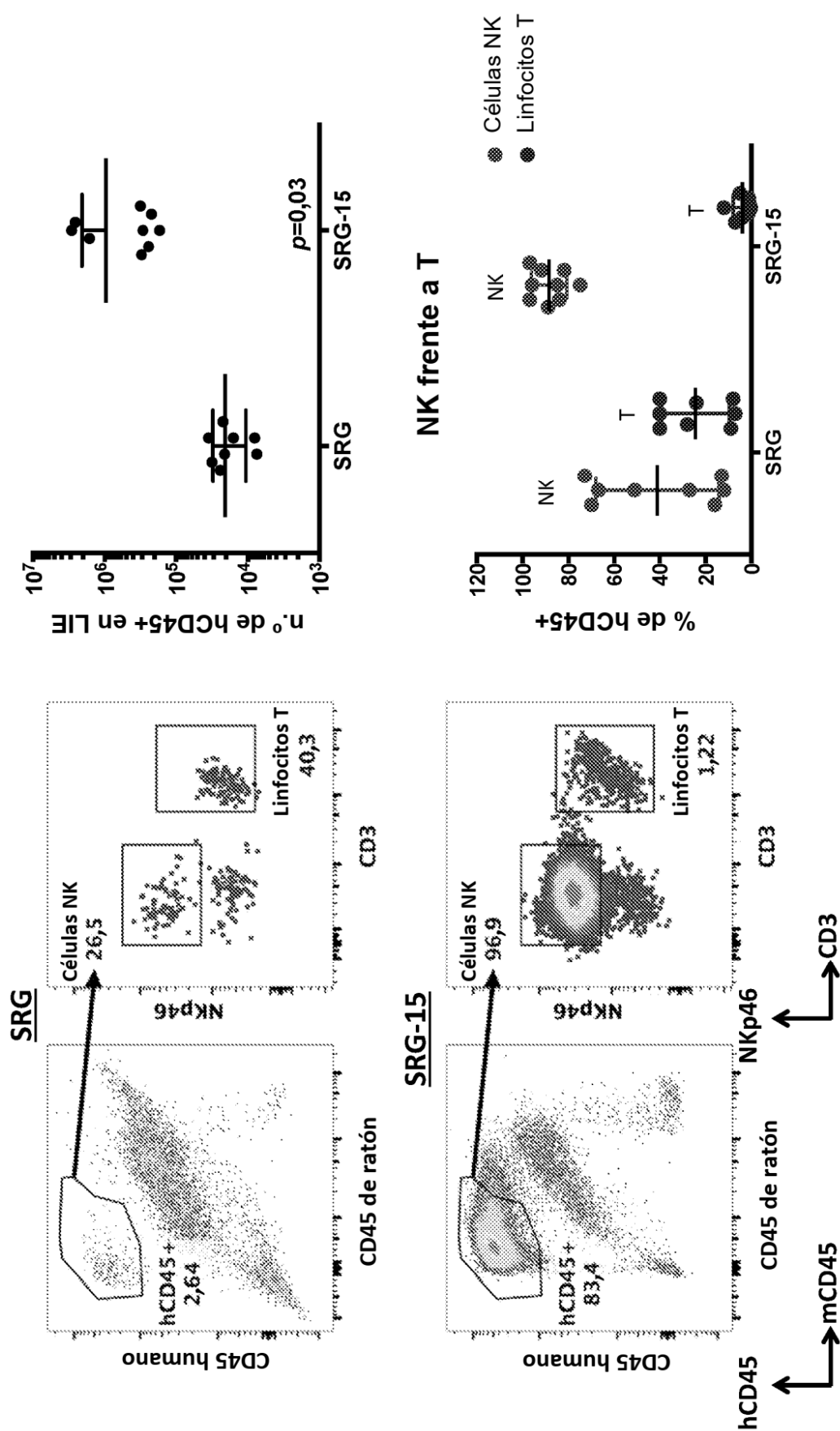
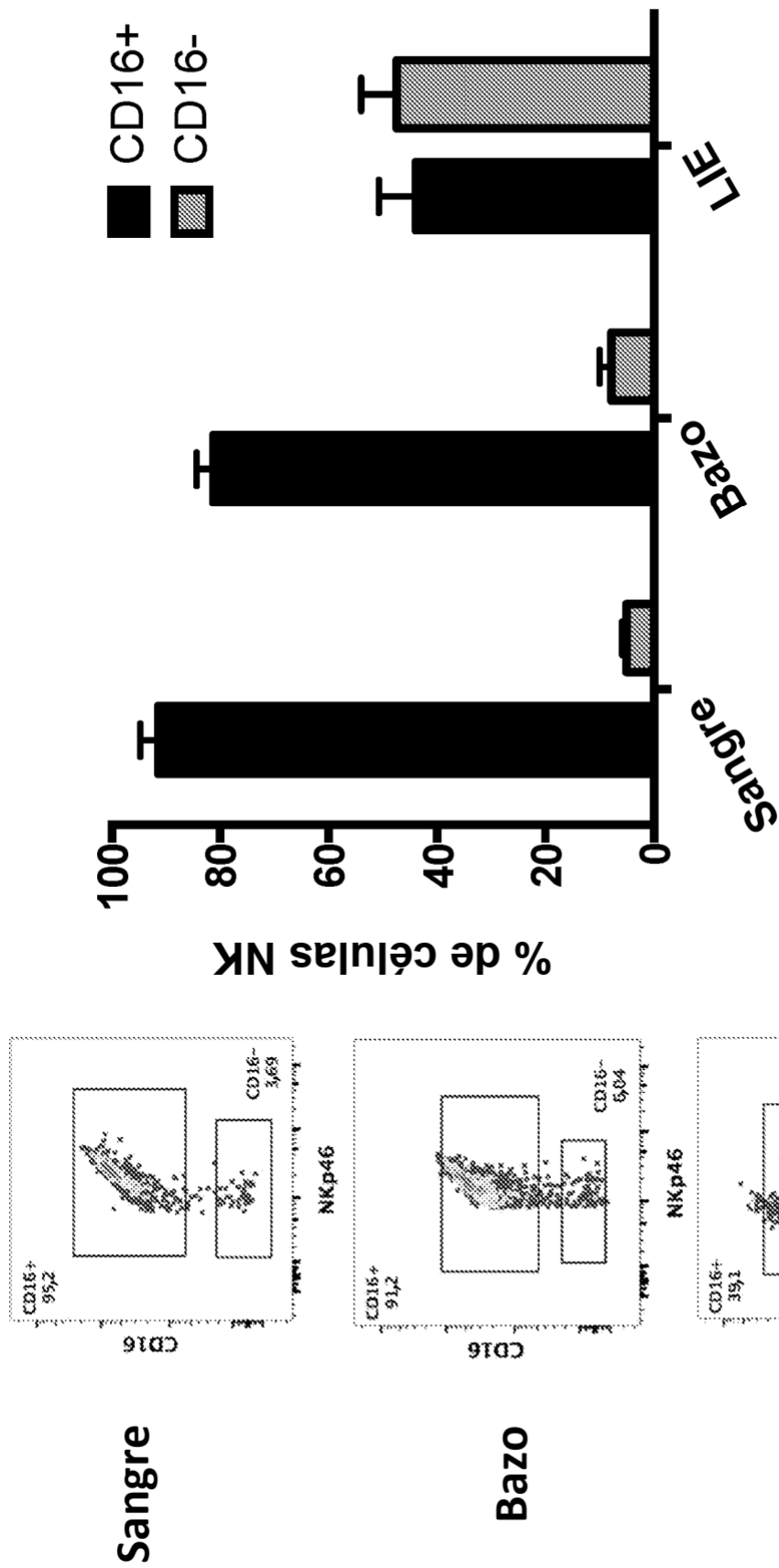


FIG. 19B



- Reflejo de la fisiología normal de GALT humano

FIG. 19C

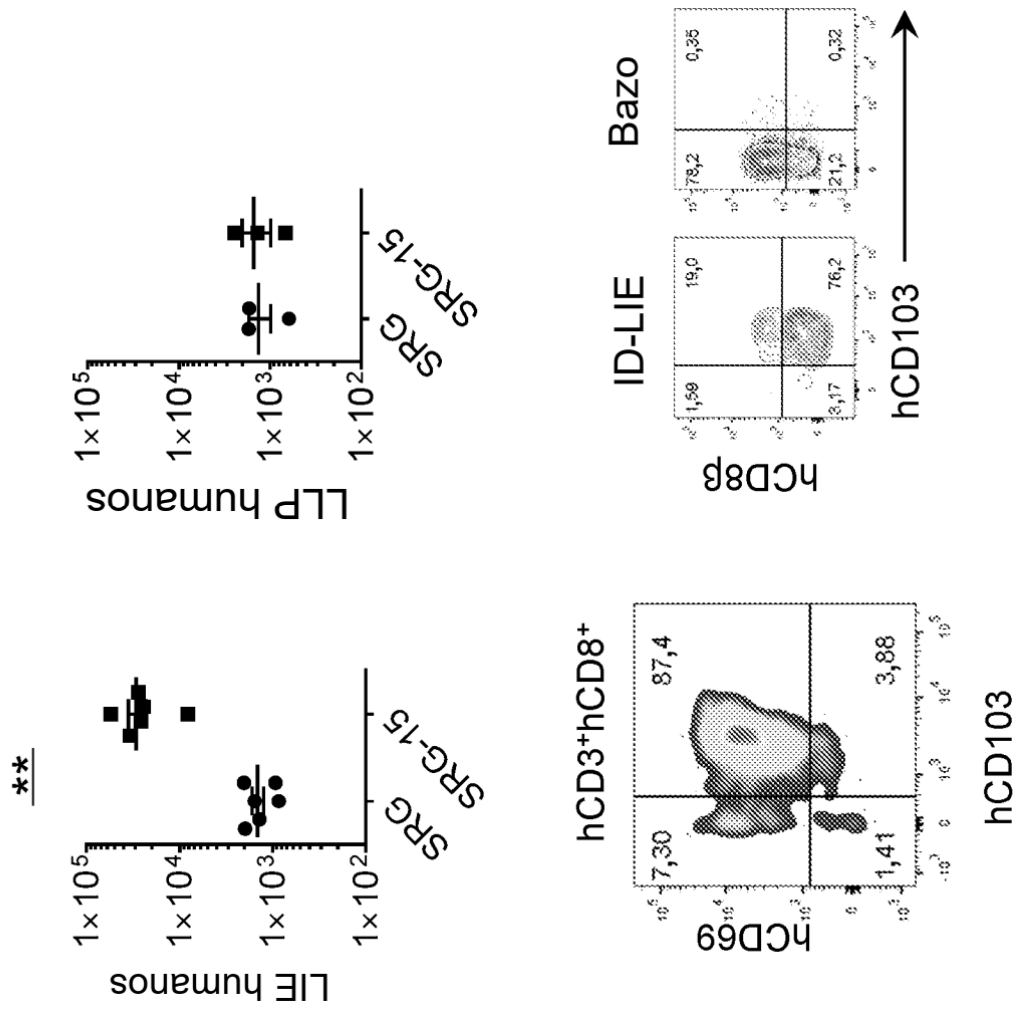


FIG. 20A

Solo los ratones SRG hIL-15^{hu/hu} tienen placas de Peyer discernibles;
con predominio de hCD45+

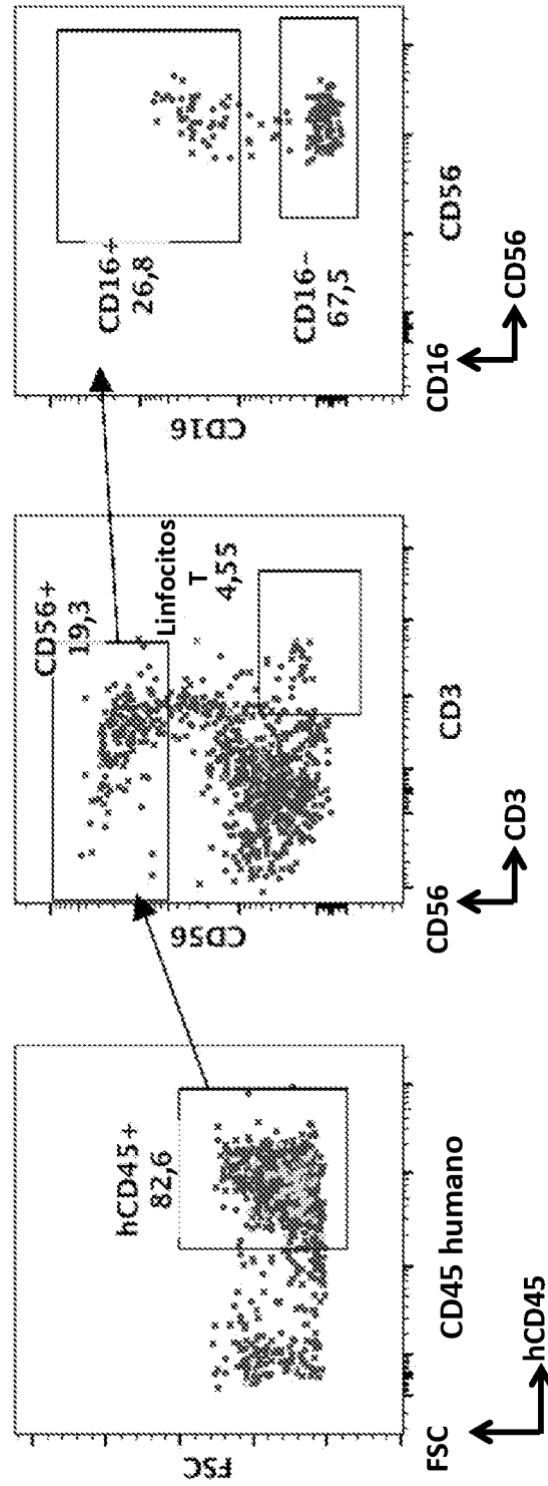


FIG. 20B

Solo los ratones hIL-15^{hu/hu} tienen placas de Peyer discernibles;
con predominio de hCD45+

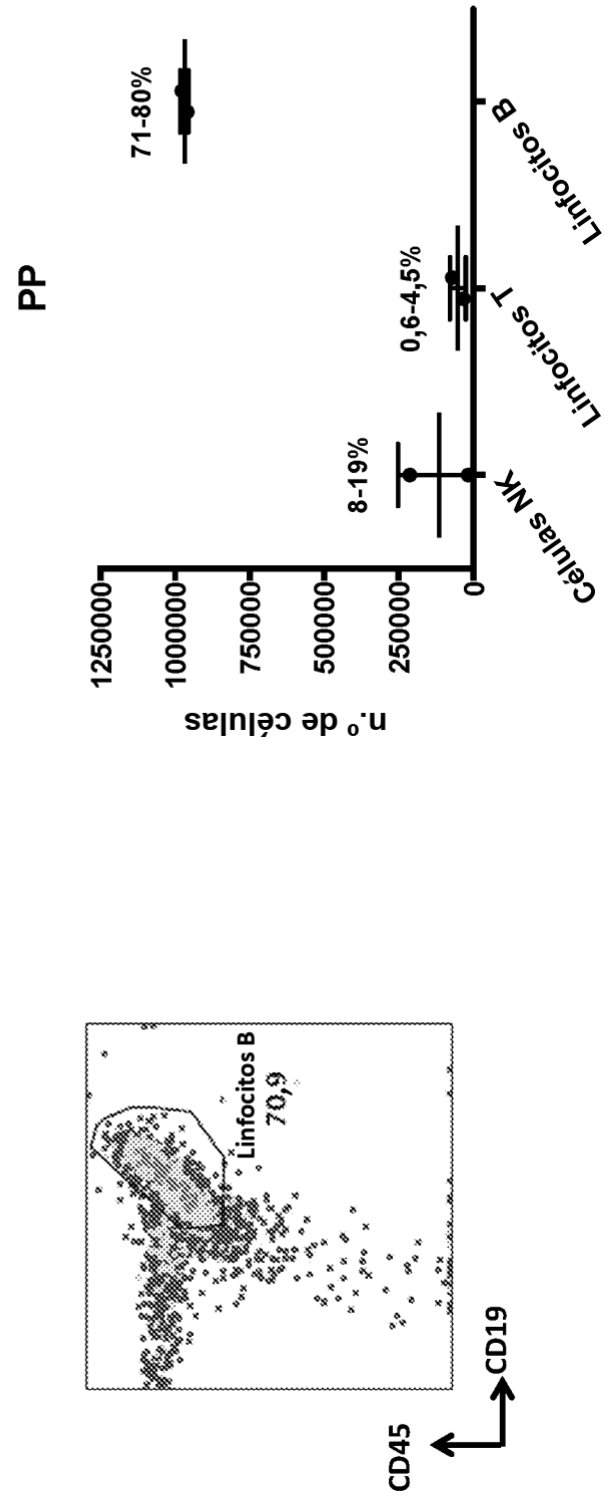


FIG. 21A

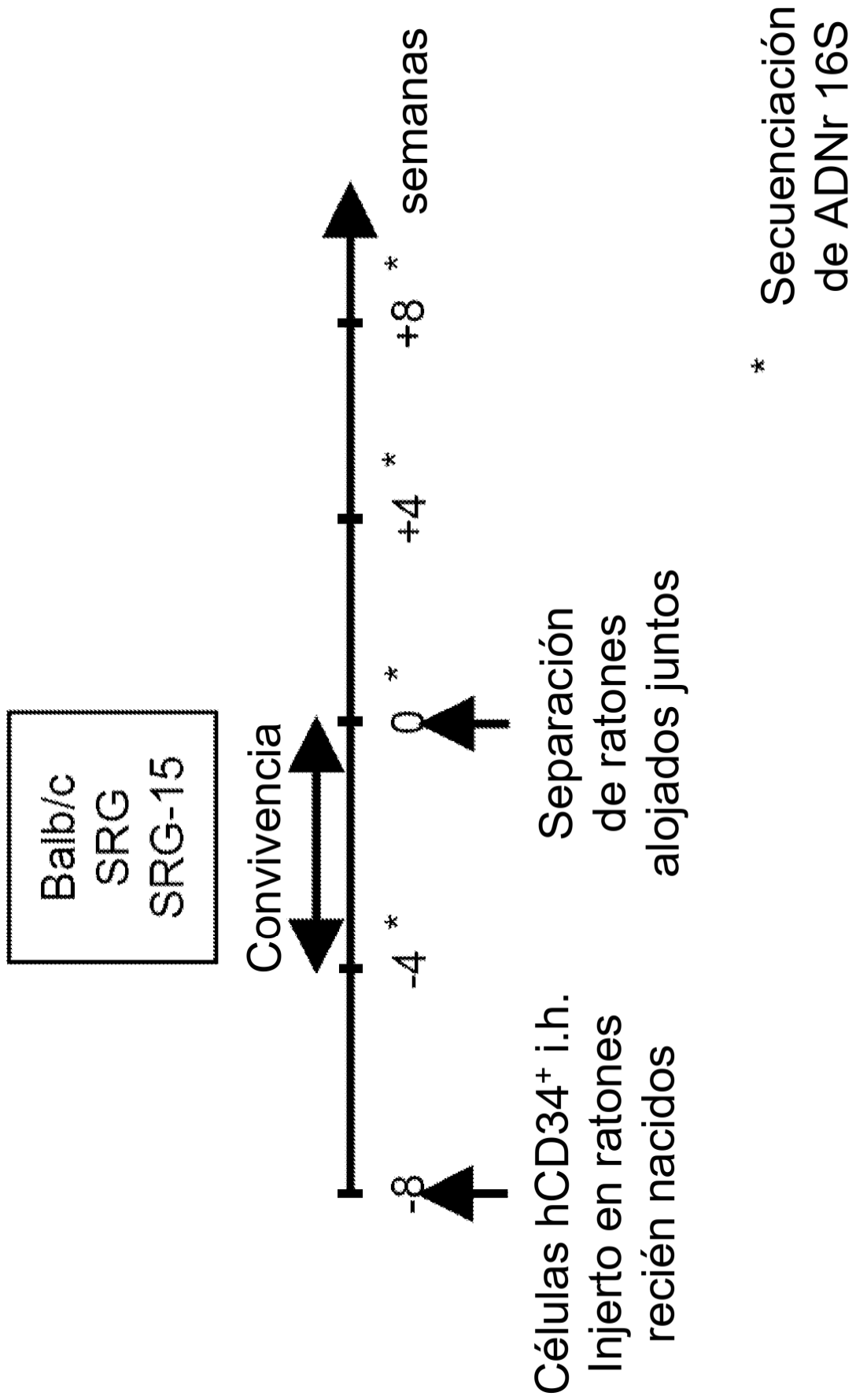


FIG. 21B

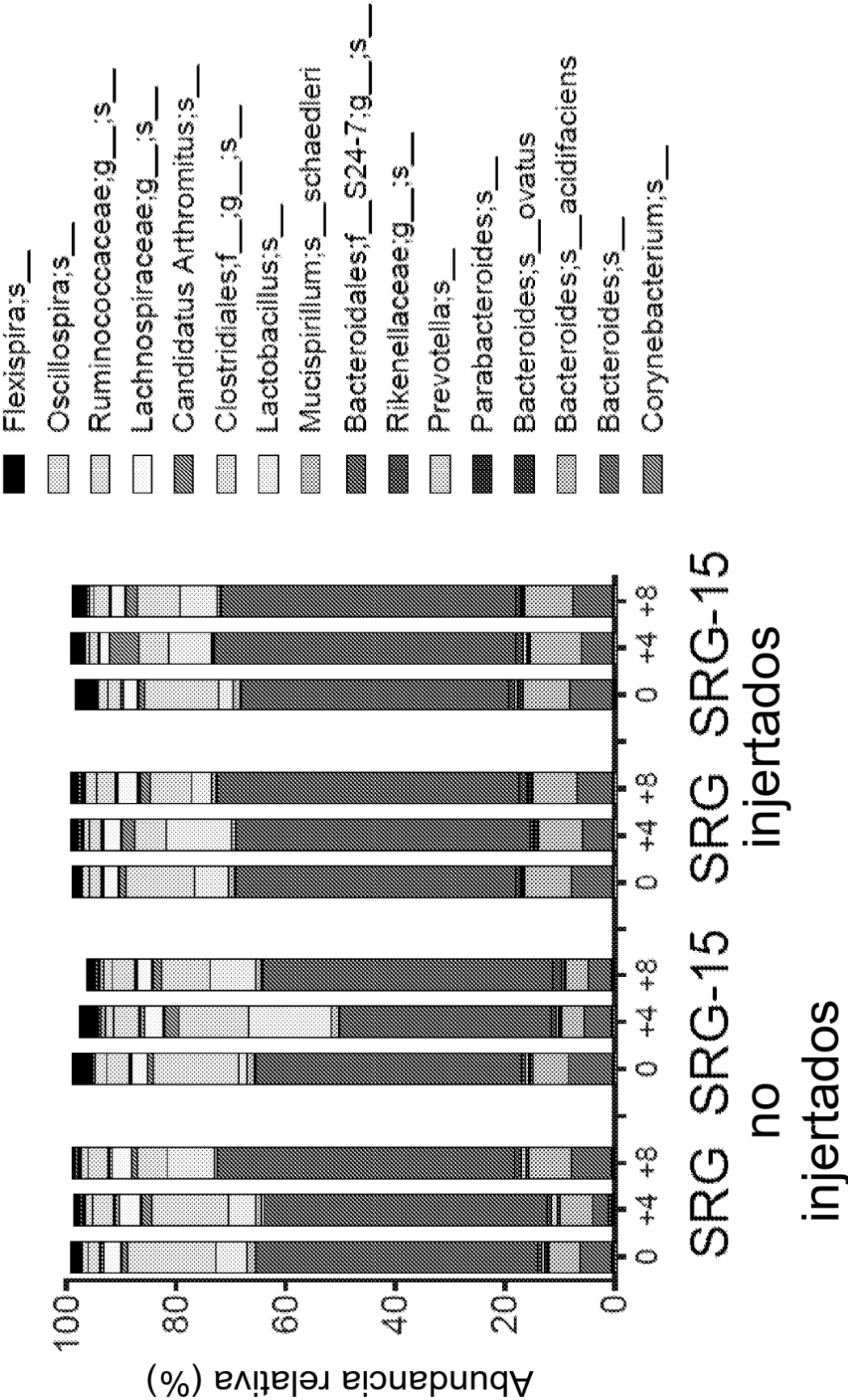
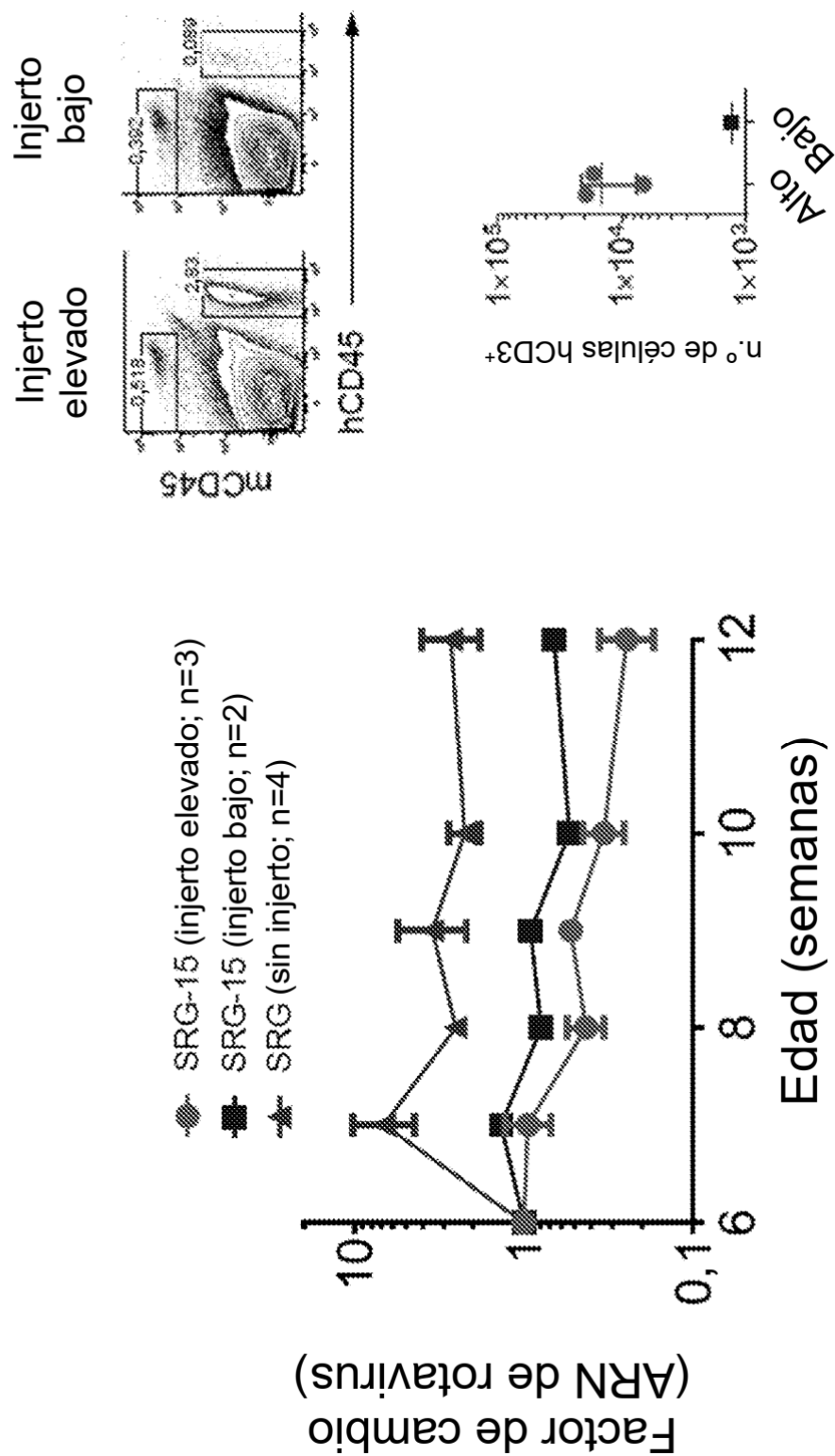


FIG. 22



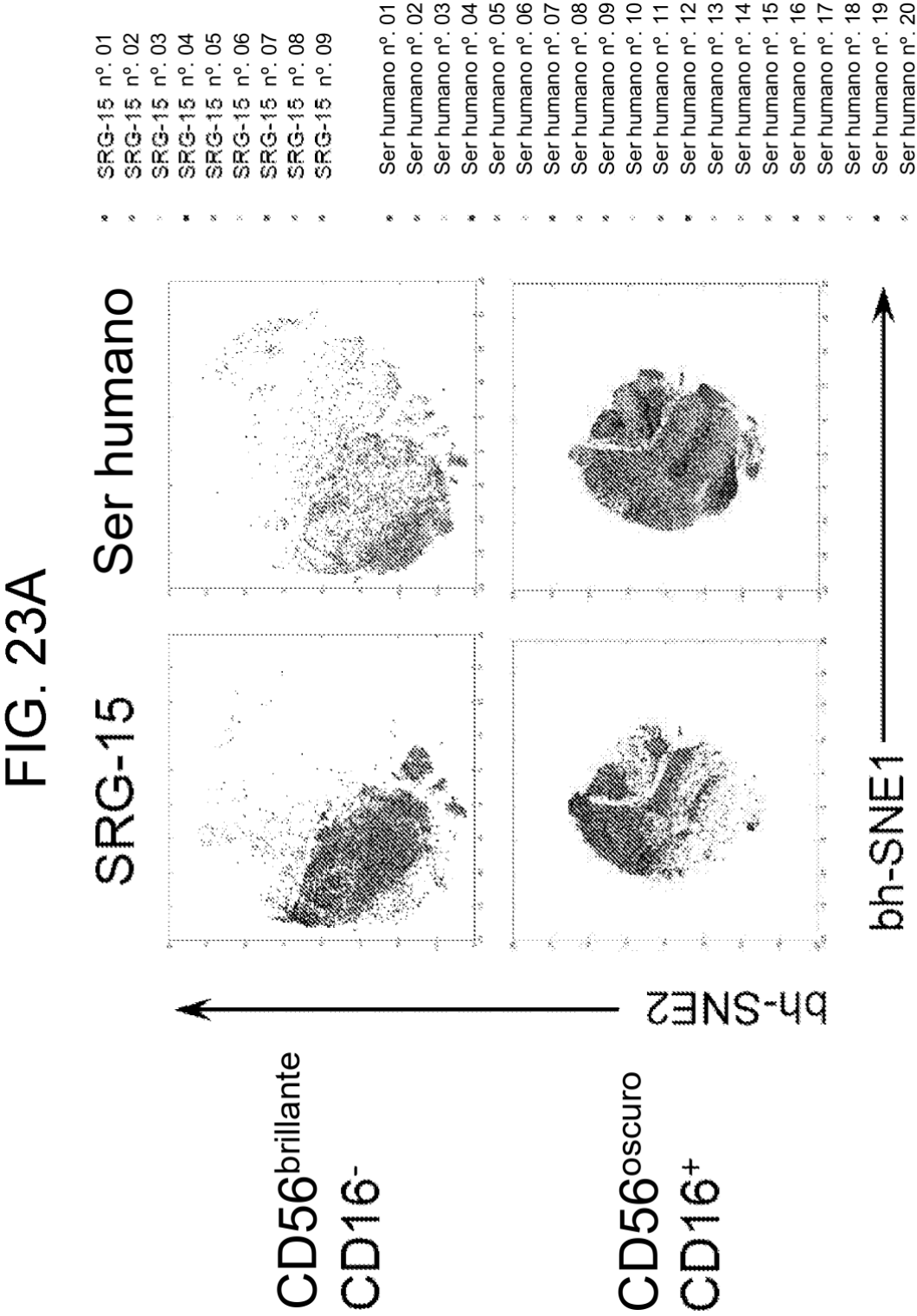


FIG. 23B

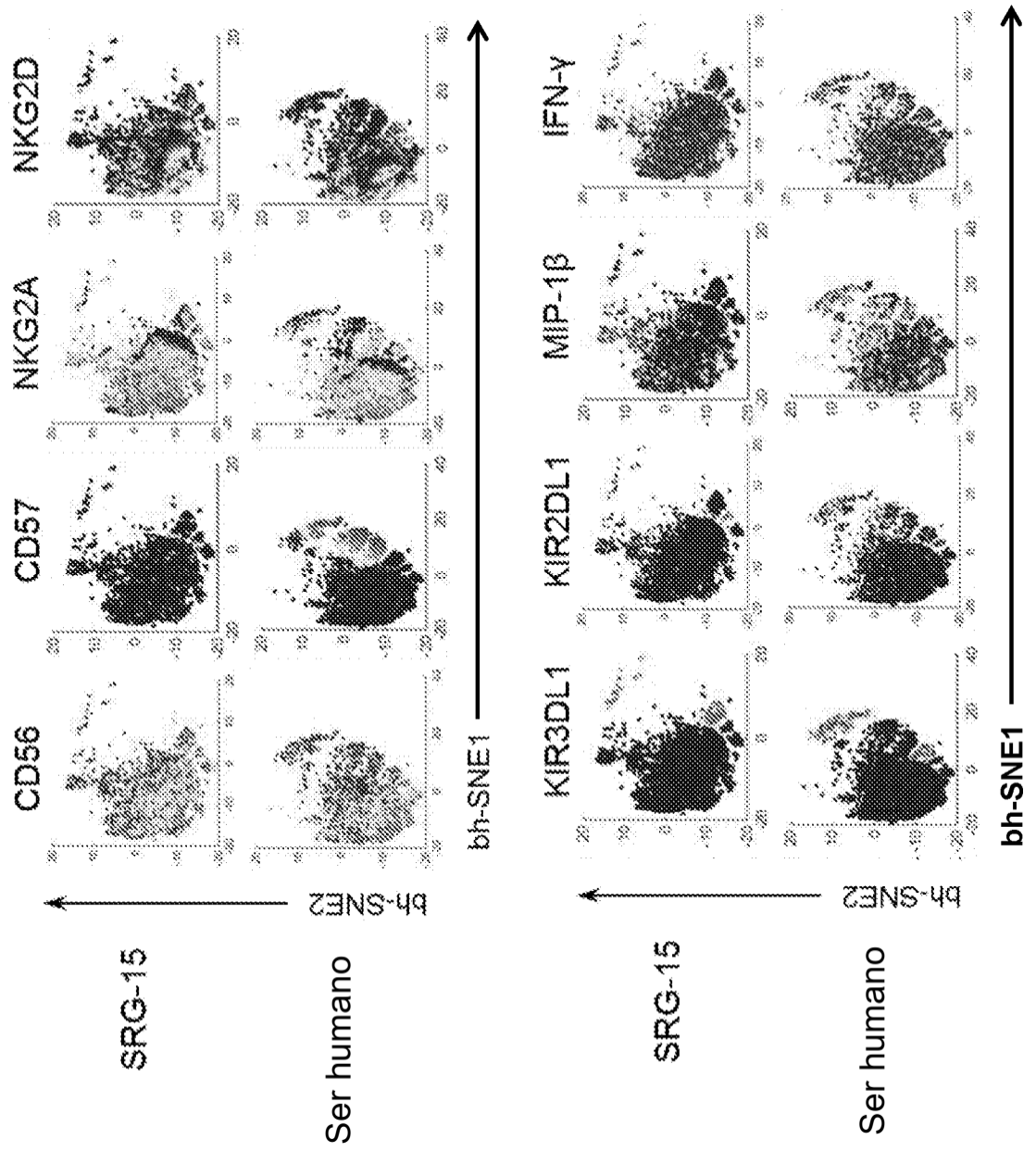


FIG. 23C

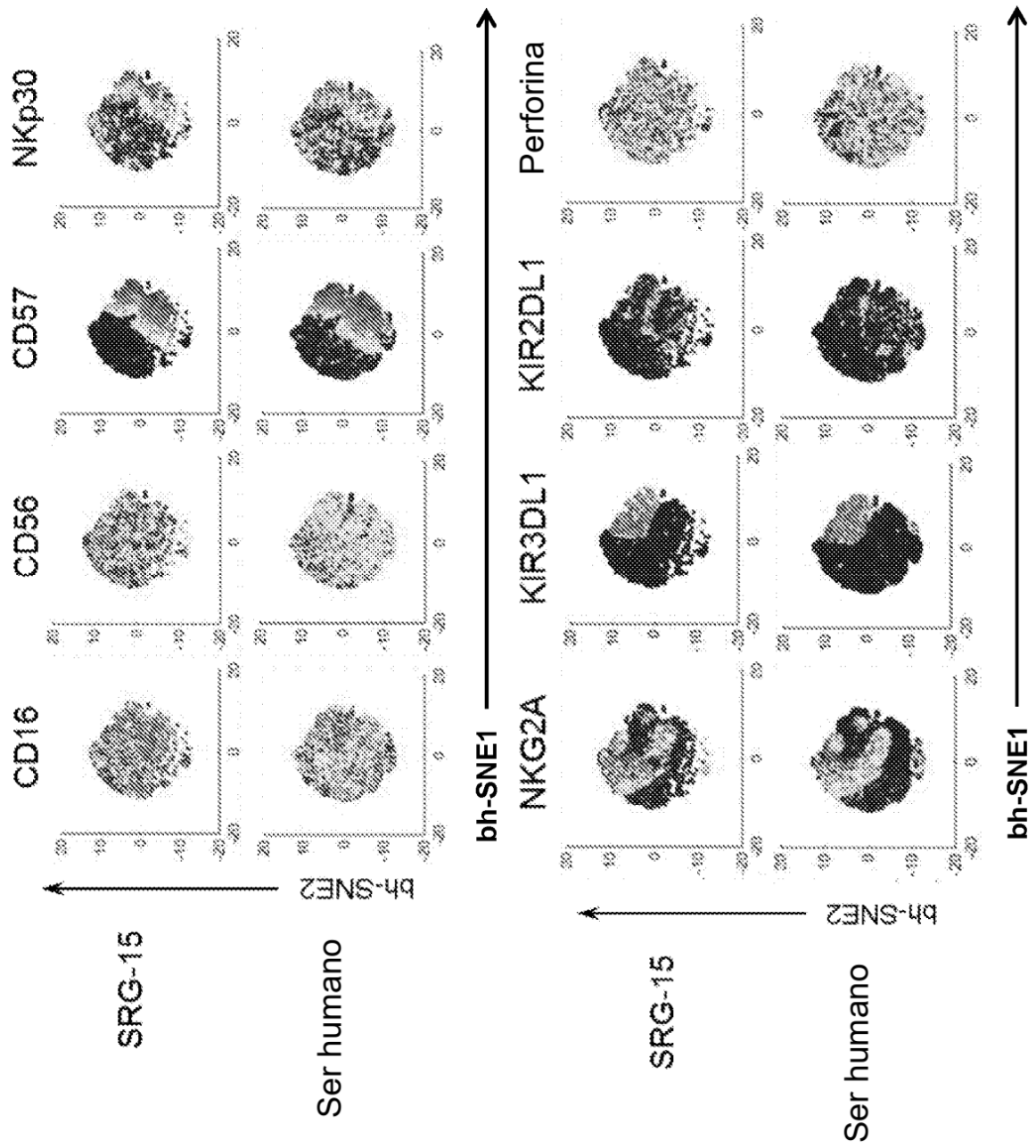


FIG. 24A

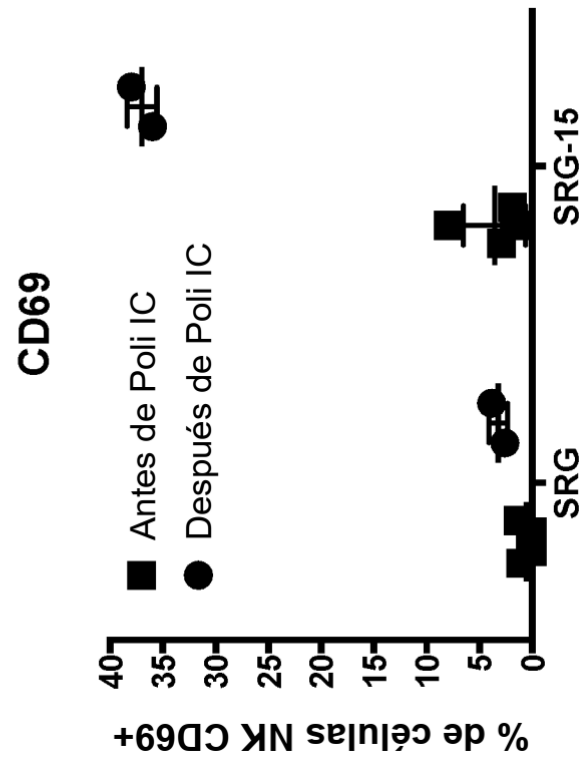


FIG. 24B

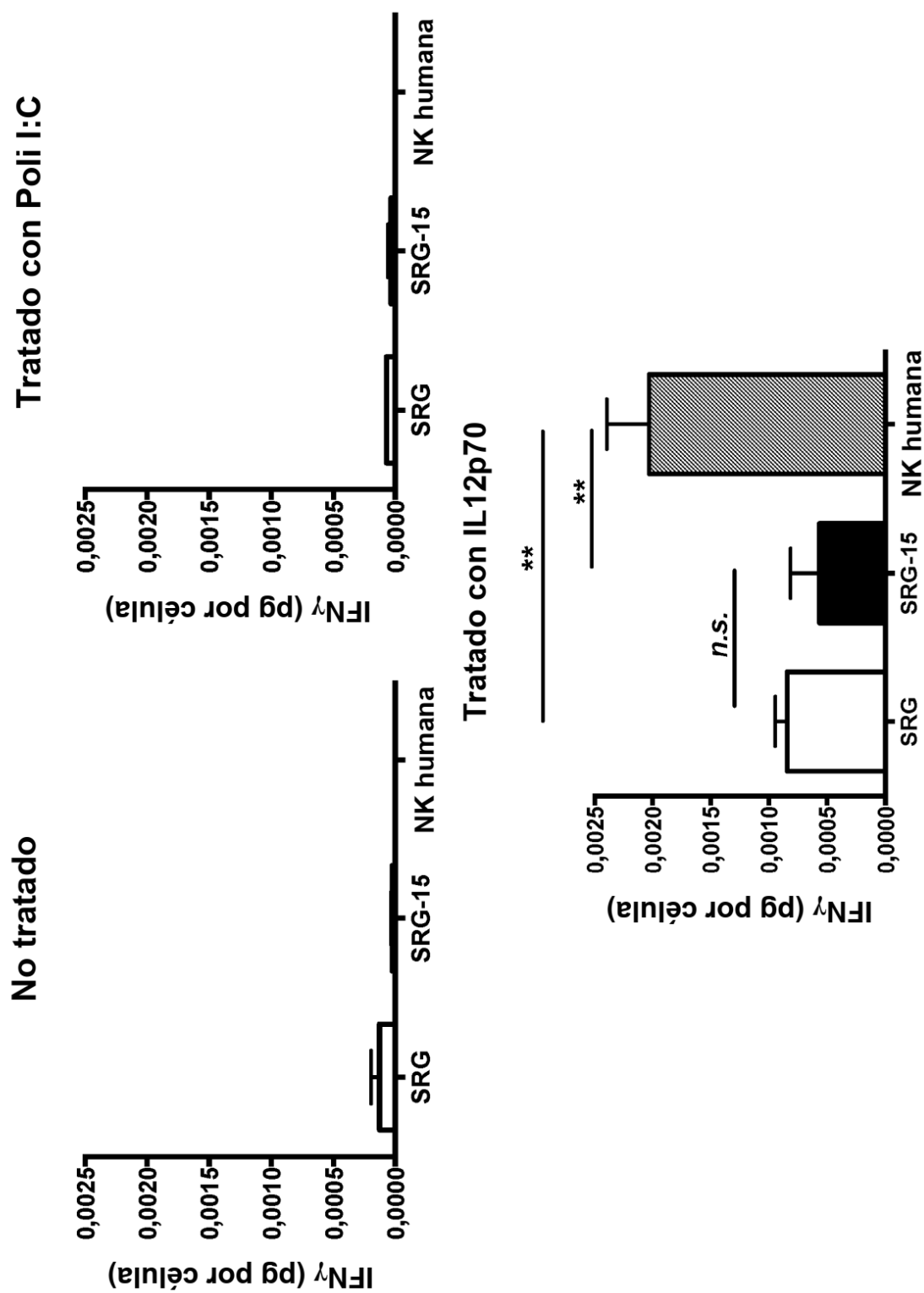


FIG. 24C

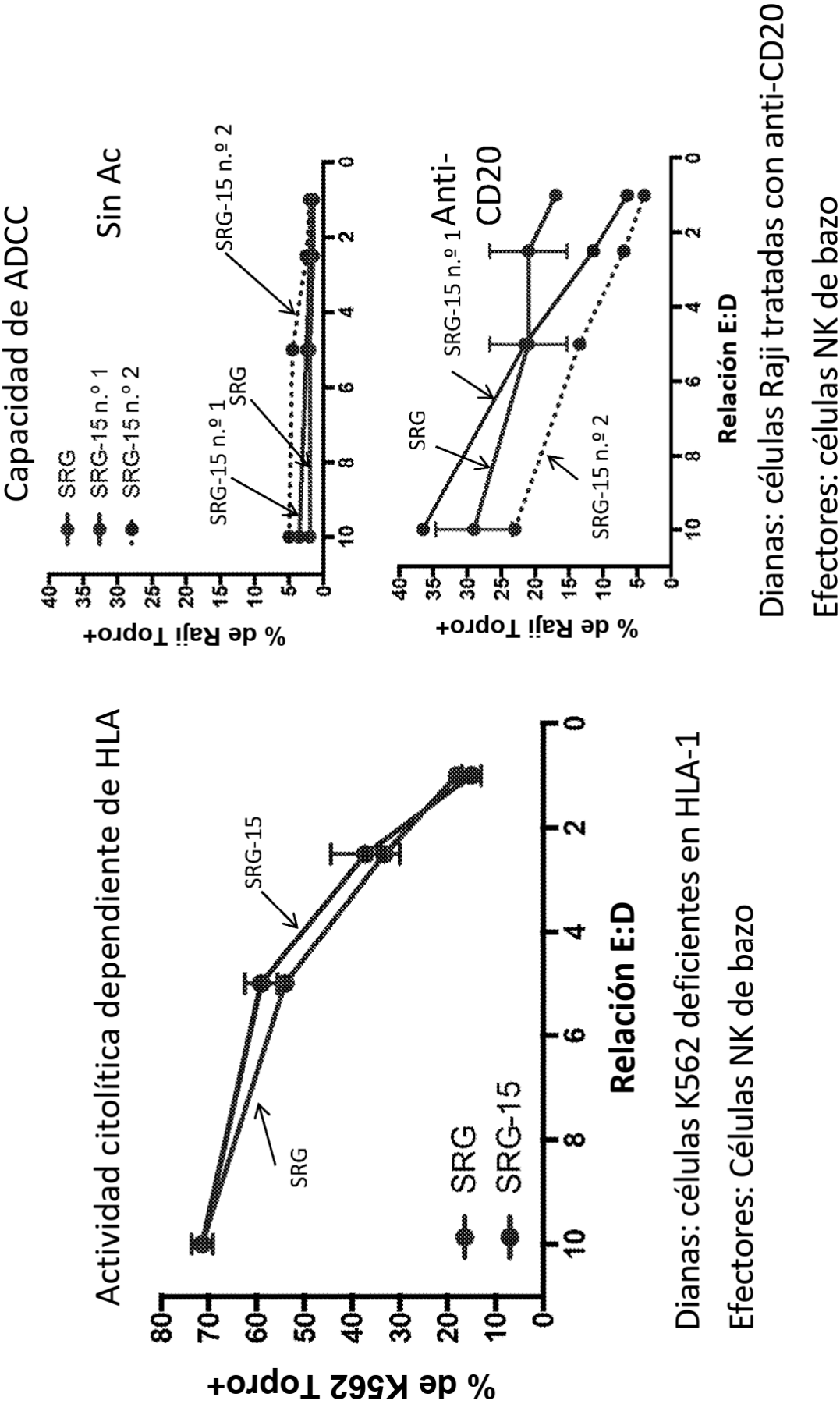


FIG. 25A

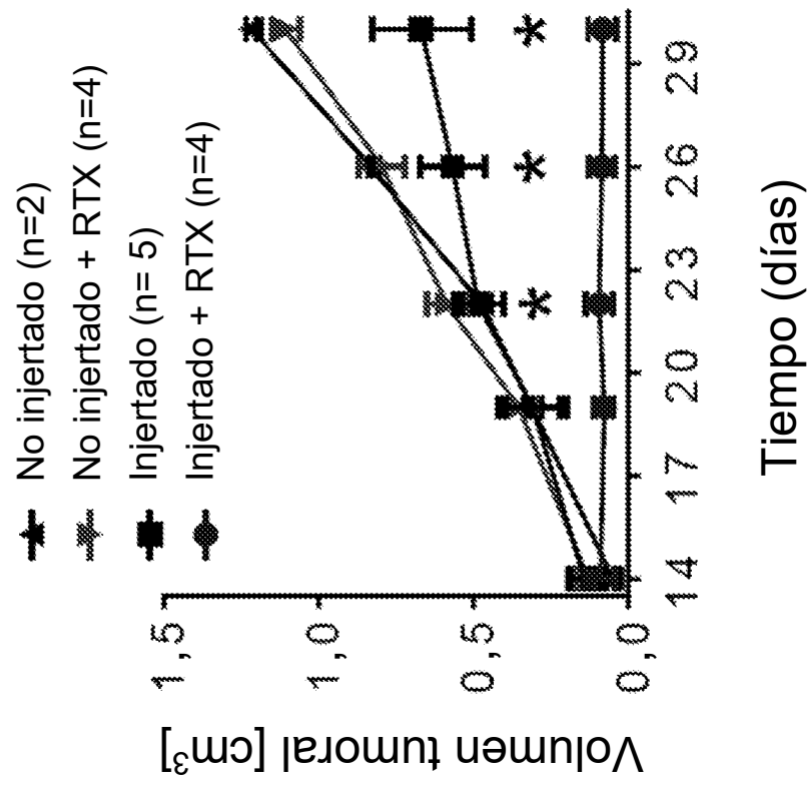


FIG. 25B

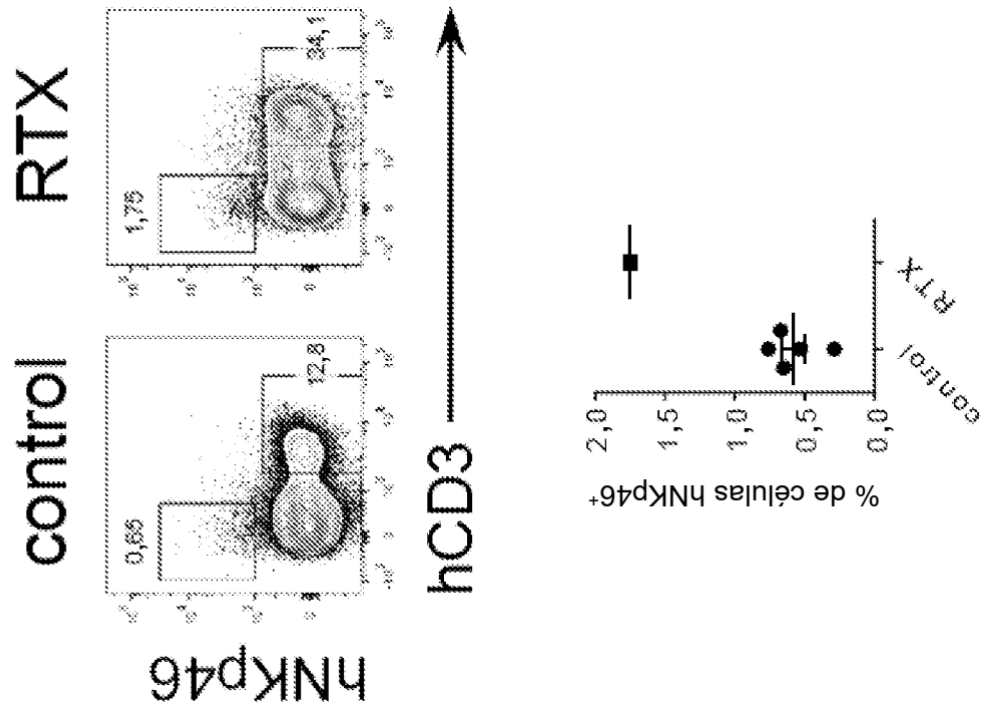


FIG. 25C

