

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2011.06.22**

(30) Prioridade(s): **2010.06.22 US 357314 P**
2010.06.22 US 357317 P

(43) Data de publicação do pedido: **2012.08.01**

(45) Data e BPI da concessão: **2016.04.06**
112/2016

(73) Titular(es):

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
777 OLD SAW MILL RIVER ROAD TARRYTOWN,
NY 10591 **US**

(72) Inventor(es):

ANDREW J. MURPHY **US**
LYNN MACDONALD **US**
KAROLINA A. HOSIAWA **US**
SEAN STEVENS* **US**
CAGAN GURER* **US**

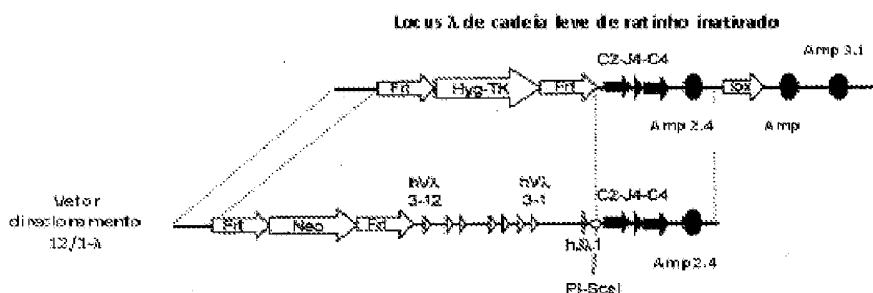
(74) Mandatário:

FERNANDO ANTÓNIO FERREIRA MAGNO
AV. 5 DE OUTUBRO, Nº 146, 7º ANDAR 1050-061 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **RATINHOS EXPRESSANDO UMA CADEIA LEVE HÍBRIDA DE IMUNOGLOBULINA**

(57) Resumo:

SÃO DISPONIBILIZADOS RATINHOS GENETICAMENTE MODIFICADOS QUE EXPRESSAM SEQUÊNCIAS VARIÁVEIS Λ HUMANAS (HVΛ), INCLUINDO RATINHOS QUE EXPRESSAM SEQUÊNCIAS HVΛ A PARTIR DE UM LOCUS Λ ENDÓGENO DE CADEIA LEVE DE RATINHO, RATINHOS QUE EXPRESSAM SEQUÊNCIAS HVΛ A PARTIR DE UM LOCUS Κ ENDÓGENO DE CADEIA LEVE DE RATINHO E RATINHOS QUE EXPRESSAM SEQUÊNCIAS HVΛ A PARTIR DE UM TRANSGENE OU DE UM EPISSOMA, EM QUE A SEQUÊNCIA HVΛ ESTÁ LIGADA A UMA SEQUÊNCIA CONSTANTE DE RATINHO. SÃO DISPONIBILIZADOS RATINHOS QUE CONSTITUEM UMA FONTE DE SEQUÊNCIAS VARIÁVEIS Λ HUMANAS MUTADAS SOMATICAMENTE ÚTEIS PARA PRODUIR PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A ANTIGÉNIO. SÃO DISPONIBILIZADAS COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA PRODUIR PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A ANTIGÉNIO QUE COMPREENDEM SEQUÊNCIAS VARIÁVEIS Λ HUMANAS, INCLUINDO ANTICORPOS HUMANOS.

RESUMO**"Ratinhos expressando uma cadeia leve híbrida de imunoglobulina"**

São disponibilizados ratinhos geneticamente modificados que expressam sequências variáveis λ humanas (hV λ), incluindo ratinhos que expressam sequências hV λ a partir de um locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho, ratinhos que expressam sequências hV λ a partir de um locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho e ratinhos que expressam sequências hV λ a partir de um transgene ou de um epissoma, em que a sequência hV λ está ligada a uma sequência constante de ratinho. São disponibilizados ratinhos que constituem uma fonte de sequências variáveis λ humanas mutadas somaticamente úteis para produzir proteínas de ligação a antígeno. São disponibilizadas composições e métodos para produzir proteínas de ligação a antígeno que compreendem sequências variáveis λ humanas, incluindo anticorpos humanos.

DESCRIÇÃO

"Ratinhos expressando uma cadeia leve híbrida de imunoglobulina"

CAMPO

Ratinhos geneticamente modificados que compreendem um segmento génico de região variável de cadeia leve λ de imunoglobulina humana (hV λ) não rearranjado e um segmento génico de junção λ humano (hJ λ) ligados funcionalmente a uma região constante de cadeia leve kappa (κ) de ratinho. Ratinhos geneticamente modificados que expressam anticorpos compreendendo uma cadeia leve de imunoglobulina compreendendo uma sequência V λ -J λ humana rearranjada e uma sequência C κ de ratinho.

ANTECEDENTES

Os ratinhos que expressam anticorpos totalmente humanos, ou parcialmente humanos e parcialmente de ratinho, são conhecidos na técnica. Por exemplo, foram referidos ratinhos transgénicos que expressam anticorpos totalmente humanos a partir de transgenes contendo genes de regiões variáveis de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobulinas humanas. Ratinhos geneticamente modificados que compreendem uma substituição dos segmentos génicos de região variável de cadeia pesada (HCVR) e dos segmentos génicos de região variável de cadeia leve kappa (κ) (LCVR) endógenos de ratinho por segmentos génicos HCVR e LCVR humanos e que produzem anticorpos quiméricos com uma cadeia kappa quimérica humana/ratinho também são conhecidos.

As cadeias leves dos anticorpos são codificadas por um de dois loci separados: kappa (κ) e lambda (λ). As cadeias leves dos anticorpos de ratinho são essencialmente do tipo κ . A razão de utilização de cadeias leves κ para λ nos seres humanos é de cerca de 60:40, ao passo que nos ratinhos é de cerca de 95:5. A utilização tendenciosa de cadeias leves κ nos ratinhos é alegadamente conservada em ratinhos geneticamente modificados capazes de expressar anticorpos total ou parcialmente humanos. Assim, os ratinhos que expressam anticorpos total ou

parcialmente humanos parecem estar limitados na utilização de regiões variáveis lambda.

Há necessidade na técnica de produzir regiões variáveis lambda, sejam elas de ratinho ou humanas, para utilizar na preparação de proteínas de ligação a epitopos. Há necessidade na técnica de dispor de ratinhos que expressem anticorpos total ou parcialmente humanos, em que os ratinhos apresentem uma maior utilização de regiões variáveis lambda ($V\lambda$).

Há necessidade na técnica de dispor de ratinhos que expressem anticorpos total ou parcialmente humanos, em que os ratinhos apresentem uma maior utilização de regiões variáveis λ ($V\lambda$). WO 00/26373 refere-se à expressão murina do locus λ de Ig humanas.

SUMÁRIO

O invento no seu sentido mais amplo é conforme definido nas reivindicações independentes. São divulgados ratinhos, embriões, células e tecidos geneticamente modificados, assim como construções de ácidos nucleicos para modificar os ratinhos, e métodos e composições para produzi-las e utilizá-las. São disponibilizados ratinhos e células que geram regiões variáveis lambda (λ) humanas no contexto de uma cadeia leve kappa (κ) de ratinho conforme exposto nas reivindicações. São também divulgados ratinhos e células que geram regiões variáveis λ humanas no contexto de uma cadeia leve κ ou uma cadeia leve λ , por exemplo, a partir de um locus endógeno de cadeia leve de ratinho. São igualmente divulgados métodos para produzir anticorpos que compreendem regiões variáveis lambda. Métodos para selecionar cadeias pesadas que são expressas com regiões variáveis lambda cognatas são também divulgados.

São divulgadas proteínas de ligação a antigénio (por exemplo, anticorpos) quiméricas e humanas, e os seus ácidos nucleicos codificantes, que compreendem regiões variáveis mutadas somaticamente, incluindo anticorpos que possuem cadeias leves compreendendo um domínio variável derivado de um $V\lambda$ humano e um segmento génico $J\lambda$ humano fundidos com um domínio constante de cadeia leve kappa de ratinho.

O presente invento disponibiliza um ratinho compreendendo um segmento génico de região variável de cadeia leve λ de imunoglobulina humana (hV λ) não rearranjado e um segmento génico de junção λ humano (hJ λ) que estão ligados funcionalmente a um segmento génico de região constante de cadeia leve kappa (C κ) de imunoglobulina de ratinho ao nível de um locus κ endógeno de cadeia leve de imunoglobulina de ratinho, em que, ao nível do referido locus, o elemento amplificador intrónico κ a montante do gene C κ (designado por Ek i) e o amplificador 3' κ a jusante do gene C κ (designado por Ek3') são mantidos, onde o ratinho expressa um anticorpo compreendendo uma cadeia leve que contém uma sequência V λ -J λ humana rearranjada e uma sequência C κ de ratinho.

O invento disponibiliza ainda:

uma célula isolada que expressa um anticorpo compreendendo uma cadeia leve que contém uma sequência V λ -J λ humana rearranjada e uma sequência C κ de ratinho, em que a célula provém, ou pode ser obtida, do ratinho de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, e em que a célula compreende um hV λ e um hJ λ que estão ligados funcionalmente a um segmento génico C κ de ratinho ao nível de um locus κ endógeno de cadeia leve de imunoglobulina de ratinho, em que, ao nível do referido locus, o elemento amplificador intrónico κ a montante do gene C κ (designado por Ek i) e o amplificador 3' κ a jusante do gene C κ (designado por Ek3') são mantidos;

uma célula-tronco embrionária (CTE) de ratinho isolada compreendendo um segmento génico de região variável de cadeia leve λ de imunoglobulina humana (hV λ) não rearranjado e um segmento génico de junção λ humano (hJ λ) que estão ligados funcionalmente a um segmento génico C κ de ratinho ao nível de um locus κ endógeno de cadeia leve de imunoglobulina de ratinho, em que, ao nível do referido locus, o elemento amplificador intrónico κ a montante do gene C κ (designado por Ek i) e o amplificador 3' κ a jusante do gene C κ (designado por Ek3') são mantidos;

um embrião de ratinho compreendendo, produzido a partir, ou que pode ser obtido a partir, da referida célula CTE de ratinho, em que o embrião de ratinho compreende um segmento

génico de região variável de cadeia leve λ de imunoglobulina humana (hV λ) não rearranjado e um segmento génico de junção λ humano (hJ λ) que estão ligados funcionalmente a um segmento génico C κ de ratinho ao nível de um locus κ endógeno de cadeia leve de imunoglobulina de ratinho, em que, ao nível do referido locus, o elemento amplificador intrónico κ a montante do gene C κ (designado por E κ i) e o amplificador 3' κ a jusante do gene C κ (designado por E κ 3') são mantidos;

um hibridoma compreendendo uma sequência génica de cadeia leve de imunoglobulina rearranjada derivada do ratinho do invento, em que a sequência rearranjada compreende um segmento génico hV λ , um segmento génico hJ λ ligados funcionalmente a um segmento génico C κ de ratinho ao nível de um locus κ endógeno de cadeia leve de imunoglobulina de ratinho, em que, ao nível do referido locus, o elemento amplificador intrónico κ a montante do gene C κ (designado por E κ i) e o amplificador 3' κ a jusante do gene C κ (designado por E κ 3') são mantidos, e onde o hibridoma expressa um anticorpo compreendendo uma cadeia leve que contém uma sequência V λ -J λ humana rearranjada e uma sequência C κ de ratinho; e

a utilização de uma célula B do invento para produzir um hibridoma compreendendo uma sequência génica de cadeia leve de imunoglobulina rearranjada derivada do ratinho de acordo com a reivindicação 1, em que a sequência rearranjada compreende um segmento génico hV λ , um segmento génico hJ λ ligados funcionalmente a um segmento génico C κ de ratinho ao nível de um locus κ endógeno de cadeia leve de imunoglobulina de ratinho, em que, ao nível do referido locus, o elemento amplificador intrónico κ a montante do gene C κ (designado por E κ i) e o amplificador 3' κ a jusante do gene C κ (designado por E κ 3') são mantidos, e onde o hibridoma expressa um anticorpo compreendendo uma cadeia leve que contém uma sequência V λ -J λ humana rearranjada e uma sequência C κ de ratinho.

O presente invento disponibiliza adicionalmente um ratinho compreendendo:

(a) 12 a 40 segmentos génicos de região variável de cadeia leve λ de imunoglobulina humana (hV λ) não rearranjados e pelo menos um segmento génico J λ humano (hJ λ) que estão ligados

funcionalmente a um gene Ck de ratinho ao nível de um locus κ endógeno de cadeia leve de imunoglobulina de ratinho, em que, ao nível do referido locus, o elemento amplificador intrónico κ a montante do gene Ck (designado por Ek1) e o amplificador 3' κ a jusante do gene Ck (designado por Ek3') são mantidos; e

(b) uma sequência de ácidos nucleicos intergénica Vk-Jk humana localizada entre os 12 a 40 segmentos génicos de região variável de cadeia leve de imunoglobulina humana e a pelo menos uma sequência de ácidos nucleicos J λ humana;

em que o ratinho expressa um anticorpo que compreende uma cadeia leve contendo uma sequência V λ -J λ humana rearranjada e uma sequência Ck de ratinho.

O presente invento proporciona ainda um método para produzir um anticorpo num ratinho, em que o método compreende: (a) expor um ratinho do invento a um antigénio; (b) permitir que o ratinho desenvolva uma resposta imune ao antigénio; e (c) isolar a partir do ratinho de (b) um anticorpo que reconhece especificamente o antigénio, ou isolar a partir do ratinho de (b) uma célula compreendendo um domínio de imunoglobulina que reconhece especificamente o antigénio, em que o anticorpo compreende uma cadeia leve derivada de um segmento génico V λ humano, um segmento génico J λ humano e um gene Ck de ratinho.

São divulgados anticorpos que compreendem (a) um domínio variável de cadeia pesada humana (hV_H) fundido com uma região constante de cadeia pesada de ratinho e (b) um V λ humano fundido com um domínio C_L de ratinho; incluindo onde um ou mais dos domínios variáveis são mutados somaticamente, por exemplo, durante a seleção de anticorpos ou de células imunes num ratinho do invento. O hV λ não rearranjado e o hJ λ não rearranjado estão ligados funcionalmente a uma região constante κ (Ck) humana ou de ratinho.

É também descrito um ratinho que compreende na sua linha germinal, ao nível de um locus endógeno de cadeia leve de ratinho, uma sequência de região variável de cadeia leve λ humana, em que a sequência de região variável lambda humana é

expressa numa cadeia leve que compreende uma sequência génica de região constante de imunoglobulina de ratinho.

O locus endógeno de cadeia leve de ratinho é um locus κ .

Num aspeto, o ratinho é desprovido de uma sequência variável de cadeia leve endógena ao nível do locus endógeno de cadeia leve de ratinho.

Num aspeto, todos ou praticamente todos os segmentos génicos de região variável de cadeia leve de ratinho endógenos são substituídos por um ou mais segmentos génicos de região variável λ humana.

Num aspeto, a sequência de região variável de cadeia leve λ humana compreende uma sequência J λ humana. Num aspeto, a sequência J λ humana é selecionada entre o grupo constituído por J λ 1, J λ 2, J λ 3, J λ 7 e uma sua combinação.

Num aspeto, a sequência de região variável de cadeia leve λ humana compreende um fragmento do cluster A do locus de cadeias leves humanas. Num aspeto específico, o fragmento do cluster A do locus λ de cadeias leves humanas estende-se de hV λ 3-27 a hV λ 3-1.

Num aspeto, a sequência de região variável de cadeia leve λ humana compreende um fragmento do cluster B do locus de cadeias leves humanas. Num aspeto específico, o fragmento do cluster B do locus λ de cadeias leves humanas estende-se de hV λ 5-52 a hV λ 1-40.

Num aspeto, a sequência de região variável de cadeia leve λ humana compreende um fragmento genómico de cluster A e um fragmento genómico de cluster B. Num aspeto, a sequência de região variável de cadeia leve λ humana compreende pelo menos um segmento génico de cluster A e pelo menos um segmento génico de cluster B.

Num aspeto, mais de 10% do repertório de cadeias leves naíve do ratinho é derivado de pelo menos dois segmentos génicos hV λ selecionados entre 2-8, 2-23, 1-40, 5-45 e 9-49. Num aspeto, mais de 20% do repertório de cadeias leves naíve

do ratinho é derivado de pelo menos três segmentos génicos hV λ selecionados entre 2-8, 2-23, 1-40, 5-45 e 9-49. Num aspeto, mais de 30% do repertório de cadeias leves naíve do ratinho é derivado de pelo menos quatro segmentos génicos hV λ selecionados entre 2-8, 2-23, 1-40, 5-45 e 9-49.

É também divulgado um ratinho que expressa uma cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma sequência V λ -J λ humana rearranjada e uma sequência C κ de ratinho, em que o ratinho apresenta uma razão de utilização κ para utilização λ de cerca de 1:1.

Num aspeto, a cadeia leve de imunoglobulina é expressa a partir de um locus endógeno de cadeia leve de ratinho.

É também divulgado um ratinho que compreende uma sequência de região variável de cadeia leve λ (V λ) e pelo menos uma sequência J (J), contíguas a uma sequência de região constante de cadeia leve κ de ratinho.

Num aspeto, o ratinho é desprovido de um segmento génico V κ de ratinho e/ou J κ de ratinho funcional.

Num aspeto, o V λ é um V λ humano (hV λ) e o J é um J λ humano (hJ λ). Num aspeto, o hV λ e o hJ λ são segmentos génicos não rearranjados.

Num aspeto, o ratinho compreende uma pluralidade de segmentos génicos hV λ não rearranjados e pelo menos um segmento génico hJ λ . Num aspeto específico, a pluralidade de segmentos génicos hV λ não rearranjados consiste em pelo menos 12 segmentos génicos, pelo menos 28 segmentos génicos ou pelo menos 40 segmentos génicos.

Num aspeto, o pelo menos um segmento génico hJ λ é selecionado entre o grupo constituído por J λ 1, J λ 2, J λ 3, J λ 7 e uma sua combinação.

Num aspeto, um locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho é eliminado na totalidade ou em parte.

Num aspeto, a sequência de região constante de cadeia leve κ de ratinho encontra-se num locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho.

Num aspeto, cerca de 10% a cerca de 45% das células B do ratinho expressam um anticorpo que compreende uma cadeia leve compreendendo um domínio variável de cadeia leve λ humana ($V\lambda$) e um domínio constante de cadeia leve κ de ratinho ($C\kappa$).

Num aspeto, o domínio variável λ humano é derivado de uma sequência $hV\lambda/hJ\lambda$ rearranjada selecionada entre o grupo constituído por 3-1/1, 3-1/7, 4-3/1, 4-3/7, 2-8/1, 3-9/1, 3-10/1, 3-1013, 3-10/7, 2-14/1, 3-19/1, 2-23/1, 3-25/1, 1-40/1, 1-40/2, 1-40/3, 1-40/7, 7-43/1, 7-43/3, 1-44/1, 1-44/7, 5-45/1, 5-45/2, 5-45/7, 7-46/1, 7-46/2, 7-46/7, 9-49/1, 9-49/2, 9-49/7 e 1-51/1.

Num aspeto, o ratinho compreende adicionalmente uma região intergénica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana de um locus κ de cadeia leve humano, em que a região intergénica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana é contígua à sequência $V\lambda$ e à sequência J . Numa concretização específica, a região intergénica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana é colocada entre a sequência $V\lambda$ e a sequência J .

É também divulgado um ratinho que expressa um anticorpo compreendendo uma cadeia leve que compreende uma sequência variável λ e uma sequência constante κ .

Num aspeto, o ratinho apresenta uma razão de utilização κ para utilização λ de cerca de 1:1.

Num aspeto, uma população de células B imaturas obtidas da medula óssea do ratinho apresenta uma razão de utilização κ para utilização λ de cerca de 1:1.

É também divulgado um ratinho geneticamente modificado, em que o ratinho compreende um $V\lambda$ de imunoglobulina não rearranjado e um segmento génico $J\lambda$ ligados funcionalmente a um locus de cadeia leve de ratinho que compreende um gene C_L de ratinho.

Os segmentos génicos $V\lambda$ e $J\lambda$ são segmentos génicos humanos.

Num aspeto, o locus endógeno de cadeia leve de ratinho é um locus κ de cadeia leve.

Os segmentos génicos $J\lambda$ e $V\lambda$ não rearranjados estão num locus kappa endógeno de cadeia leve de ratinho.

Num aspeto, o ratinho compreende adicionalmente uma substituição de um ou mais segmentos génicos V, D e/ou J de cadeia pesada por um ou mais segmentos génicos V, D e/ou J humanos ao nível de um locus endógeno de cadeia pesada de imunoglobulina de ratinho.

O ratinho compreende um segmento génico $V\lambda$ de imunoglobulina humana não rearranjado e um segmento génico $J\lambda$ num locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho que compreende um gene $C\kappa$ de ratinho.

O locus de genes variáveis de cadeias leves (o "locus $V\kappa$ ") compreende pelo menos um segmento génico $V\lambda$ humano ($hV\lambda$) e pelo menos um segmento génico $J\lambda$ humano ($hJ\lambda$). Noutro aspeto, o locus $V\kappa$ compreende até quatro segmentos génicos $hJ\lambda$. Numa concretização, o locus V_L compreende uma sequência contígua compreendendo uma sequência genómica λ humana, conforme exposto nas reivindicações.

Num aspeto, o locus κ compreende até quatro segmentos génicos $hJ\lambda$. Num aspeto, o locus κ compreende pelo menos um $hV\lambda$ e pelo menos um $hJ\lambda$, e é desprovido ou substancialmente desprovido de um segmento génico de região $V\kappa$ funcional e é desprovido ou substancialmente desprovido de um segmento génico de região $J\kappa$ funcional. Num aspeto, o ratinho não compreende nenhum segmento génico de região $V\kappa$ funcional. Num aspeto, o ratinho não compreende nenhum segmento génico de região $J\kappa$ funcional.

Num aspeto, o locus $V\kappa$ compreende uma pluralidade de segmentos $hV\lambda$. Num aspeto, a pluralidade de segmentos $hV\lambda$ é selecionada de forma a resultar na expressão de um repertório de regiões variáveis de cadeia leve λ que reflita cerca de

10%, cerca de 20%, cerca de 30%, cerca de 40%, cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80% ou cerca de 90% ou mais da utilização V λ observada num ser humano. Num aspeto, o locus V κ compreende os segmentos génicos hV λ 1-40, 1-44, 2-8, 2-14, 3-21 e uma sua combinação.

Num aspeto, os segmentos hV λ incluem 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11 e 3-12. Num aspeto específico, o locus V κ compreende uma sequência contígua do locus λ de cadeia leve humano que abrange de V λ 3-12 a V λ 3-1. Num aspeto, o locus V μ compreende pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 segmentos hV λ . Num aspeto específico, os hV λ incluem 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11 e 3-12. Num aspeto específico, o locus V κ compreende uma sequência contígua do locus λ humano que abrange de V λ 3-12 a V λ 3-1. Num aspeto específico, o locus λ endógeno de cadeia leve é eliminado parcial ou totalmente.

Num aspeto, o locus V κ compreende 13 a 28 ou mais segmentos hV λ . Num aspeto específico, os segmentos hV λ incluem 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25 e 3-27. Num aspeto específico, o locus κ compreende uma sequência contígua do locus λ humano que abrange de V λ 3-27 a V λ 3-1. O locus V κ situa-se no locus κ endógeno. Num aspeto específico, o locus λ endógeno de cadeia leve é eliminado parcial ou totalmente.

Num aspeto, o locus V κ compreende 29 a 40 segmentos hV λ . Num aspeto específico, o locus κ compreende uma sequência contígua do locus λ humano que abrange de V λ 3-29 a V λ 3-1 e uma sequência contígua do locus λ humano que abrange de V λ 5-52 a V λ 1-40. Num aspeto específico, toda ou praticamente toda a sequência entre hV λ 1-40 e hV λ 3-29 no ratinho geneticamente modificado consiste essencialmente numa sequência λ humana de aproximadamente 959 bp encontrada na natureza (por exemplo, na população humana) a jusante do segmento génico hV λ 1-40 (a jusante da porção 3' não traduzida), um sítio de uma enzima de restrição (por exemplo, PI-SceI), seguido de uma sequência λ humana de aproximadamente 3431 bp a montante do segmento génico hV λ 3-29 encontrada na natureza. Num aspeto específico, o locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho é eliminado parcial ou totalmente.

O locus V_k compreende pelo menos um $hJ\lambda$. Num aspeto, o locus V_k compreende uma pluralidade de $hJ\lambda$. Num aspeto, o locus V_k compreende pelo menos 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 $hJ\lambda$. Num aspeto específico, o locus V_k compreende quatro $hJ\lambda$. Num aspeto específico, os quatro $hJ\lambda$ são $hJ\lambda_1$, $hJ\lambda_2$, $hJ\lambda_3$ e $hJ\lambda_7$. Num aspeto específico, o locus λ endógeno de cadeia leve é eliminado parcial ou totalmente. Num aspeto, o locus V_k compreende um $hJ\lambda$. Num aspeto específico, o um $hJ\lambda$ é $hJ\lambda_1$. Num aspeto específico, o locus λ endógeno de cadeia leve é eliminado parcial ou totalmente.

O locus V_k compreende pelo menos um $hV\lambda$, pelo menos um $hJ\lambda$ e um gene C_k de ratinho.

Num aspeto, o ratinho compreende uma substituição, ao nível do locus k endógeno de ratinho, de segmentos génicos V_k endógenos de ratinho por um ou mais segmentos génicos $hV\lambda$, em que os segmentos génicos $hV\lambda$ estão ligados funcionalmente a um gene da região C_k endógena de ratinho, de forma que o ratinho rearranja os segmentos génicos $V\lambda$ humanos e expressa uma cadeia leve quimérica inversa de imunoglobulina que compreende um domínio $V\lambda$ humano e um C_k de ratinho. Num aspeto, 90-100% dos segmentos génicos V_k de ratinho não rearranjados são substituídos por pelo menos um segmento génico $hV\lambda$ não rearranjado. Num aspeto específico, todos ou praticamente todos os segmentos génicos V_k endógenos de ratinho são substituídos por pelo menos um segmento génico $hV\lambda$ não rearranjado. Num aspeto, a substituição é por pelo menos 12, pelo menos 28 ou pelo menos 40 segmentos génicos $hV\lambda$ não rearranjados. Num aspeto, a substituição é por pelo menos 7 segmentos génicos $hV\lambda$ não rearranjados funcionais, pelo menos 16 segmentos génicos $hV\lambda$ não rearranjados funcionais ou pelo menos 27 segmentos génicos $hV\lambda$ não rearranjados funcionais. Num aspeto, o ratinho compreende uma substituição de todos os segmentos génicos J_k de ratinho por pelo menos um segmento génico $hJ\lambda$ não rearranjado. Num aspeto, o pelo menos um segmento génico $hJ\lambda$ não rearranjado é selecionado entre $J\lambda_1$, $J\lambda_2$, $J\lambda_3$, $J\lambda_4$, $J\lambda_5$, $J\lambda_6$, $J\lambda_7$ e uma sua combinação. Num aspeto específico, o um ou mais segmento génico $hV\lambda$ é selecionado entre um segmento génico $hV\lambda$ 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, 3-12, 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, 3-27, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 5-48, 9-49, 1-50, 1-51, 5-

52 e uma sua combinação. Num aspeto específico, o pelo menos um segmento génico hJ λ não rearranjado é selecionado entre J λ 1, J λ 2, J λ 3, J λ 7 e uma sua combinação.

É também descrito um ratinho geneticamente modificado que compreende uma sequência de região intergénica V κ -J κ humana localizada num locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho.

Num aspeto, a sequência de região intergénica V κ -J κ humana situa-se num locus κ endógeno de cadeia leve de um ratinho que compreende um hV λ e um segmento génico hJ λ , e a sequência de região intergénica V κ -J κ humana é colocada entre os segmentos génicos hV λ e hJ λ . Num aspeto específico, os segmentos génicos hV λ e hJ λ são capazes de sofrer recombinação para formar um domínio variável de cadeia leve λ humana funcional no ratinho.

É também divulgado um ratinho que compreende uma pluralidade de hV λ e um ou mais hJ λ , e a sequência de região intergénica V κ -J κ humana é colocada, em relação à transcrição, a jusante da sequência hV λ proximal ou mais 3' e a montante ou em 5' da primeira sequência hJ λ .

Num aspeto, a região intergénica V κ -J κ humana é uma região localizada cerca de 130 bp a jusante ou 3' de um segmento génico V κ 4-1 humano, cerca de 130 bp a jusante da região 3' não traduzida do segmento génico V κ 4-1 humano e que se estende até cerca de 600 bp a montante ou 5' de um segmento génico J κ 1 humano. Num aspeto específico, a região intergénica V κ -J κ humana tem cerca de 22,8 kb. Num aspeto, a região intergénica V κ -J κ é cerca de 90% ou mais, 91% ou mais, 92% ou mais, 93% ou mais, 94% ou mais ou cerca de 95% ou mais idêntica a uma região intergénica V κ -J κ humana que se estende desde a extremidade da região 3' não traduzida de um segmento génico V κ 4-1 humano até cerca de 600 bp a montante de um segmento génico J κ 1 humano. Num aspeto, a região intergénica V κ -J κ compreende a SEQ ID NO:100. Num aspeto específico, a região intergénica V κ -J κ compreende um fragmento funcional de SEQ ID NO:100. Num aspeto específico, a região intergénica V κ -J κ é a SEQ ID NO:100.

É também divulgada uma célula de ratinho (por exemplo, uma célula-tronco embrionária de ratinho), um embrião de ratinho e um tecido de ratinho que compreendem a sequência de região intergénica V κ -J κ humana descrita, em que a sequência

de região intergénica é ectópica. Num aspeto específico, a sequência ectópica é colocada num locus endógeno humanizado de imunoglobulina de ratinho.

É igualmente divulgada uma construção de ácidos nucleicos isolada que compreende a sequência de região intergénica Vk-Jk humana descrita. Num aspeto, a construção de ácidos nucleicos compreende braços de direcionamento para direcionar a sequência de região intergénica Vk-Jk humana para um locus de cadeia leve de ratinho. Num aspeto específico, o locus de cadeia leve de ratinho é um locus κ . Num aspeto específico, os braços de direcionamento direcionam a região intergénica Vk-Jk humana para um locus κ endógeno de ratinho modificado, em que o direcionamento é para uma posição entre uma sequência hV λ e uma sequência hJ λ .

É também divulgado um ratinho geneticamente modificado, em que o ratinho compreende não mais de dois alelos de cadeia leve, onde os alelos de cadeia leve compreendem (a) um segmento V λ de imunoglobulina humana não rearranjado e um segmento génico J λ , num locus endógeno de cadeia leve de ratinho que compreende um gene C_L de ratinho; e (b) um segmento V_L de imunoglobulina não rearranjado e um segmento génico J_L, num locus endógeno de cadeia leve de ratinho que compreende um gene C_L de ratinho.

Num aspeto, o locus endógeno de cadeia leve de ratinho é um locus κ . Noutro aspeto, o locus endógeno de cadeia leve de ratinho é um locus λ .

Num aspeto, os não mais de dois alelos de cadeia leve são selecionados entre um alelo κ e um alelo λ , dois alelos κ e dois alelos λ . Num aspeto específico, um dos dois alelos de cadeia leve é um alelo λ que compreende um gene C λ 2.

Num aspeto, o ratinho compreende um locus de cadeia leve de imunoglobulina funcional e um locus de cadeia leve não funcional, em que o locus de cadeia leve funcional compreende um segmento V λ de imunoglobulina humana não rearranjado e um segmento génico J λ , num locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho que compreende um gene C κ de ratinho.

Num aspeto, o ratinho compreende um locus de cadeia leve de imunoglobulina funcional e um locus de cadeia leve não funcional, em que o locus de cadeia leve funcional compreende um segmento V λ de imunoglobulina humana não rearranjado e um segmento génico J λ , num locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho que compreende um gene C λ de ratinho. Num aspeto, o gene C λ é C λ 2. Num aspeto específico, o gene C λ de ratinho é pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% idêntico ao gene C λ 2 de ratinho.

Num aspeto, o ratinho compreende ainda pelo menos um alelo de cadeia pesada de imunoglobulina. Num aspeto, o pelo menos um alelo de cadeia pesada de imunoglobulina compreende um segmento génico V_H humano, um segmento génico D_H humano e um segmento génico J_H humano, num locus endógeno de cadeia pesada de ratinho que compreende um gene de cadeia pesada humana que expressa uma cadeia pesada humana/ratinho. Num aspeto específico, o ratinho compreende dois alelos de cadeia pesada de imunoglobulina e o ratinho expressa uma cadeia pesada humana/ratinho.

Num aspeto, o ratinho compreende um primeiro alelo de cadeia leve que compreende um hV κ não rearranjado e um hJ κ não rearranjado, num locus κ endógeno de ratinho que compreende um gene C κ endógeno; e um segundo alelo de cadeia leve que compreende um hV λ não rearranjado e um hJ λ não rearranjado, num locus κ endógeno de ratinho que compreende um gene C κ endógeno. Num aspeto específico, o primeiro e o segundo alelos de cadeia leve são os únicos alelos de cadeia leve funcionais do ratinho geneticamente modificado. Num aspeto específico, o ratinho compreende um locus λ não funcional. Num aspeto, o ratinho modificado geneticamente não expressa uma cadeia leve compreendendo uma região constante λ .

Num aspeto, o ratinho compreende um primeiro alelo de cadeia leve que compreende um hV κ não rearranjado e um hJ κ não rearranjado, num locus κ endógeno de ratinho que compreende um gene C κ endógeno; e um segundo alelo de cadeia leve que compreende um hV λ não rearranjado e um hJ λ não rearranjado, num locus λ endógeno de ratinho que compreende um gene C λ endógeno. Num aspeto específico, o primeiro e o segundo alelos

de cadeia leve são os únicos alelos de cadeia leve funcionais do ratinho geneticamente modificado. Num aspeto, o gene $C\lambda$ endógeno é $C\lambda 2$. Num aspeto específico, o gene $C\lambda$ de ratinho é pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% idêntico ao $C\lambda 2$ de ratinho.

Num aspeto, o ratinho compreende seis alelos de imunoglobulina, em que o primeiro alelo compreende um segmento génico $V\lambda$ e $J\lambda$ de imunoglobulina não rearranjado, num locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho que compreende um gene $C\kappa$ de ratinho; o segundo compreende um segmento génico $V\kappa$ e $J\kappa$ de imunoglobulina não rearranjado, num locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho que compreende um gene $C\kappa$ de ratinho; o terceiro compreende um segmento génico $V\lambda$ e $J\lambda$ de imunoglobulina não rearranjado, num locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho que compreende um gene $C\lambda$ de ratinho; o quarto e o quinto compreendem, de forma independente, um segmento génico V_H e D_H e J_H não rearranjado, num locus endógeno de cadeia pesada de ratinho que compreende um gene de cadeia pesada de ratinho; e o sexto compreende ou (a) um segmento génico $V\lambda$ e $J\lambda$ de imunoglobulina não rearranjado, num locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho que compreende um gene $C\lambda$ de ratinho ou (b) um locus λ que é não funcional ou (c) uma eliminação total ou parcial do locus λ .

Num aspeto, o primeiro alelo compreende um $hV\lambda$ e $hJ\lambda$ não rearranjado. Num aspeto, o segundo alelo compreende um $hV\kappa$ e $hJ\kappa$ não rearranjado. Num aspeto, o terceiro alelo compreende um $hV\lambda$ e $hJ\lambda$ não rearranjado. Num aspeto, o quarto e quinto alelos compreendem, de forma independente, um hV_H e hD_H e hJ_H não rearranjado. Num aspeto, o sexto alelo compreende um locus λ endógeno de ratinho que é eliminado total ou parcialmente.

Num aspeto, o ratinho compreende seis alelos de imunoglobulina, em que o primeiro alelo compreende um segmento génico $V\lambda$ e $J\lambda$ de imunoglobulina não rearranjado, num locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho que compreende um gene $C\lambda$ de ratinho; o segundo compreende um segmento génico $V\lambda$ e $J\lambda$ de imunoglobulina não rearranjado, num locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho que compreende um gene $C\lambda$ de ratinho; o terceiro compreende um segmento génico $V\kappa$ e $J\kappa$ de

imunoglobulina não rearranjado, num locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho que compreende um gene C κ de ratinho; o quarto e o quinto compreendem, de forma independente, um segmento génico V_H e D_H e J_H não rearranjado, num locus endógeno de cadeia pesada de ratinho que compreende um gene de cadeia pesada de ratinho; e o sexto compreende ou (a) um segmento génico V κ e J κ de imunoglobulina não rearranjado, num locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho que compreende um gene C κ de ratinho ou (b) um locus κ que é não funcional ou (c) uma eliminação de um ou mais elementos do locus κ .

Num aspeto, o primeiro alelo compreende um segmento génico hV λ e hJ λ não rearranjado. Num aspeto, o segundo alelo compreende um segmento génico hV λ e hJ λ não rearranjado. Num aspeto, o terceiro alelo compreende um segmento génico hV κ e hJ κ não rearranjado. Num aspeto, o quarto e quinto alelos compreendem, de forma independente, um segmento génico hV_H e hD_H e hJ_H não rearranjado. Num aspeto, o sexto alelo compreende um locus κ endógeno de ratinho que está funcionalmente silenciado.

Num aspeto, o ratinho geneticamente modificado compreende uma célula B que contém um gene de anticorpo rearranjado compreendendo um domínio hV λ rearranjado ligado funcionalmente a um domínio C κ de ratinho.

É também divulgado um ratinho geneticamente modificado, que expressa um anticorpo compreendendo uma cadeia leve que compreende uma sequência V λ -J λ humana rearranjada e uma sequência C κ de ratinho.

Num aspeto, cerca de 10-50% dos esplenócitos do ratinho são células B (isto é, CD19+), ou que cerca de 9-28% expressam uma cadeia leve de imunoglobulina compreendendo um domínio hV λ fundido com um domínio C κ de ratinho.

Num aspeto específico, cerca de 23-34% dos esplenócitos do ratinho são células B (isto é, CD19+), ou que cerca de 9-11% expressam uma cadeia leve de imunoglobulina compreendendo um domínio hV λ fundido com um domínio C κ de ratinho.

Num aspeto específico, cerca de 19-31% dos esplenócitos do ratinho são células B (isto é, CD19+), ou que cerca de 9-

17% expressam uma cadeia leve de imunoglobulina compreendendo um domínio hV λ fundido com um domínio C κ de ratinho.

Num aspeto específico, cerca de 21-38% dos esplenócitos do ratinho são células B (isto é, CD19+), ou que cerca de 24-27% expressam uma cadeia leve de imunoglobulina compreendendo um domínio hV λ fundido com um domínio C κ de ratinho.

Num aspeto específico, cerca de 10-14% dos esplenócitos do ratinho são células B (isto é, CD19+), ou que cerca de 9-13% expressam uma cadeia leve de imunoglobulina compreendendo um domínio hV λ fundido com um domínio C κ de ratinho.

Num aspeto específico, cerca de 31-48% dos esplenócitos do ratinho são células B (isto é, CD19+), ou que cerca de 15-21% expressam uma cadeia leve de imunoglobulina compreendendo um domínio hV λ fundido com um domínio C κ de ratinho. Num aspeto específico, cerca de 30-38% dos esplenócitos do ratinho são células B (isto é, CD19+), das quais cerca de 33-48% expressam uma cadeia leve de imunoglobulina compreendendo um domínio hV λ fundido com um domínio C κ de ratinho.

Num aspeto, cerca de 52-70% da medula óssea do ratinho são células B (isto é, CD19+), ou que cerca de 31-47% das células B imaturas (isto é, CD19+/intermediárias B220+/IgM+) expressam uma cadeia leve de imunoglobulina compreendendo um domínio hV λ fundido com um domínio C κ de ratinho.

Num aspeto, cerca de 60% da medula óssea do ratinho são células B (isto é, CD19+), ou que cerca de 38,3% das células B imaturas (isto é, CD19+/intermediárias B220+/IgM+) expressam uma cadeia leve de imunoglobulina compreendendo um domínio hV λ fundido com um domínio C κ de ratinho.

É também divulgado um ratinho que expressa um anticorpo compreendendo uma cadeia leve que compreende uma sequência V λ -J λ humana rearranjada e uma sequência C κ de ratinho. O gene da região constante de ratinho é um gene C κ . Num aspeto específico, o anticorpo compreende ainda uma cadeia pesada compreendendo um domínio variável derivado de um segmento génico V humano, um segmento génico D humano e um segmento génico J humano, e um domínio constante de cadeia pesada

derivado de um gene de região constante de cadeia pesada de ratinho. Num aspeto, o gene da região constante de cadeia pesada de ratinho compreende uma sequência dobradiça-CH₂-CH₃ de um domínio constante de cadeia pesada. Noutro aspeto, o gene da região constante de cadeia pesada de ratinho compreende uma sequência CH₁-dobradiça-CH₂-CH₃ de um domínio constante de cadeia pesada. Noutro aspeto, o gene da região constante de cadeia pesada de ratinho compreende uma sequência CH₁-CH₂-CH₃-CH₄ de um domínio constante de cadeia pesada. Noutro aspeto, o gene da região constante de cadeia pesada de ratinho compreende uma sequência CH₂-CH₃-CH₄ de um domínio constante de cadeia pesada.

O ratinho expressa um anticorpo compreendendo uma cadeia leve que compreende uma sequência V λ -J λ humana rearranjada e uma sequência C κ de ratinho. Num aspeto, a sequência V λ -J λ humana rearranjada deriva de um rearranjo de segmentos génicos hV λ selecionados entre um segmento génico 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-14, 3-19, 2-23, 3-25, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 9-49 e 1-51. Num aspeto, a sequência V λ -J λ humana rearranjada deriva de um rearranjo de segmentos génicos hJ λ selecionados entre um segmento génico J λ 1, J λ 2, J λ 3 e J λ 7.

Num aspeto, o ratinho expressa um anticorpo compreendendo uma cadeia leve que compreende uma região variável de cadeia leve λ de imunoglobulina rearranjada compreendendo uma sequência V λ /J λ humana selecionada entre 3-1/1, 3-1/7, 4-3/1, 4-3/7, 2-8/1, 3-9/1, 3-10/1, 3-10/3, 3-10/7, 2-14/1, 3-19/1, 2-23/1, 3-25/1, 1-40/1, 1-40/2, 1-40/3, 1-40/7, 7-43/1, 7-43/3, 1-44/1, 1-44/7, 5-45/1, 5-45/2, 5-45/7, 7-46/1, 7-46/2, 7-46/7, 9-49/1, 9-49/2, 9-49/7 e 1-51/1. Num aspeto específico, a célula B expressa um anticorpo compreendendo um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina humana fundido com um domínio constante de cadeia pesada de ratinho, e um domínio variável de cadeia leve λ de imunoglobulina humana fundido com um domínio constante de cadeia leve κ de ratinho.

É igualmente divulgado um ratinho que expressa um anticorpo compreendendo (a) uma cadeia pesada compreendendo um domínio variável de cadeia pesada derivado de um segmento génico de região variável de cadeia pesada humana não rearranjado, em que o domínio variável de cadeia pesada está

fundido com uma região constante de cadeia pesada (C_H) de ratinho; e (b) uma cadeia leve compreendendo um domínio variável de cadeia leve derivado de um $hV\lambda$ não rearranjado e um $hJ\lambda$, em que o domínio variável de cadeia leve está fundido com uma região C_k de ratinho.

Num aspeto, o ratinho compreende (i) um locus de cadeia pesada que compreende uma substituição da totalidade ou da quase totalidade dos segmentos génicos V, D e J endógenos de ratinho funcionais por uma totalidade ou quase totalidade de segmentos génicos V, D e J humanos funcionais, e um gene C_H de ratinho, (ii) um primeiro locus k de cadeia leve compreendendo uma substituição da totalidade ou da quase totalidade dos segmentos génicos V_k e J_k endógenos de ratinho funcionais por uma totalidade, quase totalidade, ou uma pluralidade de, segmentos génicos $hV\lambda$ e $hJ\lambda$ funcionais, e um gene C_k de ratinho, (iii) um segundo locus k de cadeia leve compreendendo uma substituição da totalidade ou da quase totalidade dos segmentos génicos V_k e J_k endógenos de ratinho funcionais por uma totalidade, quase totalidade, ou uma pluralidade de, segmentos génicos hV_k e hJ_k funcionais, e um gene C_k de ratinho. Num aspeto, o ratinho não expressa um anticorpo que compreende uma região $C\lambda$. Num aspeto, o ratinho compreende uma eliminação de um gene $C\lambda$ e/ou de um $V\lambda$ e/ou de um segmento génico $J\lambda$. Num aspeto, o ratinho compreende um locus λ de cadeia leve não funcional. Num aspeto específico, o locus λ de cadeia leve é eliminado total ou parcialmente.

Num aspeto, o ratinho compreende (i) um locus de cadeia pesada que compreende uma substituição da totalidade ou da quase totalidade dos segmentos génicos V, D e J endógenos de ratinho funcionais por uma totalidade ou quase totalidade de segmentos génicos V, D e J humanos funcionais, e um gene C_H de ratinho, (ii) um primeiro locus λ de cadeia leve compreendendo uma substituição da totalidade ou da quase totalidade dos segmentos génicos $V\lambda$ e $J\lambda$ endógenos de ratinho funcionais por uma totalidade, quase totalidade, ou uma pluralidade de, segmentos génicos $hV\lambda$ e $hJ\lambda$ funcionais, e um gene $C\lambda$ de ratinho, (iii) um segundo locus λ de cadeia leve compreendendo uma substituição da totalidade ou da quase totalidade dos segmentos génicos $V\lambda$ e $J\lambda$ endógenos de ratinho funcionais por uma totalidade, quase totalidade, ou uma pluralidade de,

segmentos génicos hV λ e hJ λ funcionais, e um gene C λ de ratinho. Num aspeto específico, o gene C λ de ratinho é C λ 2. Num aspeto específico, o gene C λ de ratinho é derivado de um gene C λ que é pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% idêntico ao gene C λ 2 de ratinho.

É igualmente descrito um ratinho geneticamente modificado que expressa um anticorpo, em que mais de 10%, mais de 15%, mais de 20%, mais de 25%, mais de 30%, mais de 35%, mais de 40%, mais de 60%, mais de 70%, mais de 80% ou mais de 90% do anticorpo IgG total produzido pelo ratinho compreende um domínio variável derivado de λ , e em que o ratinho expressa anticorpos compreendendo um domínio variável derivado de κ fundido com uma região C κ de ratinho. Em aspetos específicos, cerca de 15-40%, 20-40%, 25-40%, 30-40% ou 35-40% do anticorpo total produzido pelo ratinho compreende um domínio variável derivado de λ .

Num aspeto, o domínio variável derivado de λ é derivado de um hV λ e um hJ λ . Num aspeto, o domínio variável derivado de λ encontra-se numa cadeia leve que compreende uma região C κ de ratinho. Num aspeto específico, a região variável derivada de λ encontra-se numa cadeia leve que compreende uma região C λ de ratinho. Noutro aspeto específico, a região C λ é uma região C λ 2. Num aspeto, o domínio variável derivado de κ é derivado de um hV κ e um hJ κ e, num aspeto específico, encontra-se numa cadeia leve que compreende uma região C κ de ratinho.

É também divulgada uma construção de ADN isolada que compreende um braço de homologia a montante e um braço de homologia a jusante, em que os braços de homologia a montante e a jusante direcionam a construção para um locus κ de ratinho, e a construção compreende um segmento hV λ não rearranjado funcional e um segmento hJ λ não rearranjado funcional e uma sequência de seleção ou marcador.

É igualmente divulgada uma construção de ADN isolada, compreendendo, de 5' para 3' em relação à direção de transcrição, um braço de direcionamento para visar uma sequência λ de ratinho a montante de V λ 2 de ratinho, uma cassette de seleção flanqueada em 5' e 3' por sítios de

reconhecimento de recombinase e um braço de direcionamento para visar uma sequência λ de ratinho em 3' de J λ 2 de ratinho. Num aspeto, a cassette de seleção é uma cassette Hyg-TK flanqueada por sítios Frt. Num aspeto, o braço de direcionamento 3' compreende C λ 2, J λ 4, C λ 4 de ratinho e o amplificador 2.4 de ratinho.

É igualmente divulgada uma construção de ADN isolada, compreendendo, de 5' para 3' em relação à direção de transcrição, um braço de direcionamento para visar o locus λ de ratinho em 5' relativamente a V λ 1, uma cassette de seleção flanqueada em 5' e 3' por sítios de reconhecimento de recombinase e um braço de direcionamento 3' para visar uma sequência λ de ratinho em 3' relativamente a C λ 1 de ratinho. Num aspeto, a cassette de seleção é uma cassette de neomicina flanqueada por sítios lox. Num aspeto, o braço de direcionamento 3' compreende o amplificador em 3' do locus λ de ratinho e o amplificador 3.1 em 3' do locus λ de ratinho.

É igualmente divulgada uma construção de ADN isolada, compreendendo, de 5' para 3' em relação à direção de transcrição, um braço de direcionamento para visar o locus λ de ratinho em 5' relativamente a V λ 2, uma cassette de seleção flanqueada em 5' e 3' por sítios de reconhecimento de recombinase e um braço de direcionamento 3' para visar uma sequência λ de ratinho em 3' relativamente a J λ 2 de ratinho e em 5' relativamente a C λ 2 de ratinho. Num aspeto, a cassette de seleção é uma cassette de higromicina-TK flanqueada por sítios Frt. Num aspeto, o braço de direcionamento 3' compreende os segmentos génicos C λ 2-J λ 4-C λ 4 de ratinho e o amplificador 2.4 do locus λ de ratinho.

É também divulgada uma construção de ADN isolada, compreendendo, de 5' para 3' em relação à direção de transcrição, um braço de direcionamento para visar o locus λ de ratinho em 5' relativamente a V λ 2, uma cassette de seleção flanqueada em 5' e 3' por sítios de reconhecimento de recombinase, um fragmento genómico humano compreendendo uma região contígua do locus λ de cadeia leve humano desde hV λ 3-12 a jusante até ao final de hJ λ 1 e um braço de direcionamento 3' para visar uma sequência λ de ratinho em 3' relativamente a J λ 2 de ratinho. Num aspeto, a cassette de seleção é uma

cassete de neomicina flanqueada por sítios Frt. Num aspeto, o braço de direcionamento 3' compreende os segmentos génicos C λ 2-J λ 4-C λ 4 de ratinho e o amplificador 2.4 do locus λ de ratinho.

É também divulgada uma construção de ADN isolada, compreendendo uma região contígua do locus λ de cadeia leve humano desde hV λ 3-12 a jusante até ao final de hJ λ 1.

É também divulgada uma construção de ADN isolada, compreendendo, de 5' para 3' em relação à direção de transcrição, um braço de direcionamento para visar o locus λ de ratinho em 5' relativamente a V λ 2, uma cassete de seleção flanqueada em 5' e 3' por sítios de reconhecimento de recombinase e um fragmento genómico humano compreendendo uma região contígua do locus λ de cadeia leve humano desde hV λ 3-27 a jusante até ao final de hV λ 2-8. Num aspeto, a cassete de seleção é uma cassete de higromicina flanqueada por sítios Frt. Num aspeto, o fragmento genómico humano compreende um braço de direcionamento 3'. Num aspeto específico, o braço de direcionamento 3' compreende cerca de 53 kb do locus λ de cadeia leve humano desde hV λ 3-12 a jusante até ao final de hV λ 2-8.

É também divulgada uma construção de ADN isolada, compreendendo uma região contígua do locus λ de cadeia leve humano desde hV λ 3-27 a jusante até ao final de hV λ 3-12.

É igualmente divulgada uma construção de ADN isolada, compreendendo, de 5' para 3' em relação à direção de transcrição, um braço de direcionamento para visar o locus λ de ratinho em 5' relativamente a V λ 2, uma cassete de seleção flanqueada em 5' e 3' por sítios de reconhecimento de recombinase, um primeiro fragmento genómico humano compreendendo uma região contígua do locus λ de cadeia leve humano desde hV λ 5-52 a jusante até ao final de hV λ 1-40, um sítio de enzima de restrição e um segundo fragmento genómico humano compreendendo uma região contígua do locus λ de cadeia leve humano desde hV λ 3-29 a jusante até ao final de hV λ 82K. Num aspeto, a cassete de seleção é uma cassete de neomicina flanqueada por sítios Frt. Num aspeto, o sítio de enzima de restrição é um sítio para uma endonuclease homing. Num aspeto

específico, a endonuclease homing é PI-SceI. Num aspeto, o segundo fragmento genómico humano é um braço de direcionamento 3'. Num aspeto específico, o braço de direcionamento 3' compreende cerca de 27 kb do locus λ de cadeia leve humano desde hV λ 3-29 a jusante até ao final de hV λ 82K.

É também divulgada uma construção de ADN isolada, compreendendo uma região contígua do locus λ de cadeia leve humano desde hV λ 5-52 a jusante até ao final de hV λ 1-40.

É igualmente divulgada uma construção de ADN isolada, compreendendo, de 5' para 3' em relação à direção de transcrição, um braço de direcionamento para visar o locus κ de ratinho em 5' relativamente aos segmentos génicos V κ endógenos, dois sítios de reconhecimento de recombinase justapostos, uma cassette de seleção em 3' dos sítios de reconhecimento de recombinase justapostos, e um braço de direcionamento 3' para visar uma sequência κ de ratinho em 5' relativamente aos segmentos génicos variáveis de cadeia leve κ . Num aspeto, os sítios de reconhecimento de recombinase justapostos têm uma orientação oposta um em relação ao outro. Num aspeto específico, os sítios de reconhecimento de recombinase são diferentes. Noutro aspeto específico, os sítios de reconhecimento de recombinase são um sítio loxP e um sítio lox511. Num aspeto, a cassette de seleção é uma cassette de neomicina.

É também divulgada uma construção de ADN isolada, compreendendo, de 5' para 3' em relação à direção de transcrição, um braço de direcionamento para visar o locus κ de ratinho em 5' relativamente aos segmentos génicos J κ de ratinho, uma cassette de seleção, um sítio de reconhecimento de recombinase em 3' da cassette de seleção, e um braço de direcionamento 3' para visar uma sequência κ de ratinho em 3' relativamente aos segmentos génicos J κ de ratinho e em 5' do amplificador intrónico κ de ratinho. Num aspeto, a cassette de seleção é uma cassette de higromicina-TK. Num aspeto, o sítio de reconhecimento de recombinase está na mesma direção da cassette de seleção em termos de transcrição. Num aspeto específico, o sítio de reconhecimento de recombinase é um sítio loxP.

É também descrita uma construção de ADN isolada, compreendendo, de 5' para 3' em relação à direção de transcrição, um primeiro fragmento genómico de ratinho compreendendo a sequência em 5' dos segmentos génicos Vk endógenos de ratinho, um primeiro sítio de reconhecimento de recombinase, um segundo sítio de reconhecimento de recombinase, e um segundo fragmento genómico de ratinho compreendendo a sequência em 3' dos segmentos génicos Jk endógenos de ratinho e em 5' do amplificador intrónico κ de ratinho.

É igualmente descrito um ratinho geneticamente modificado, em que a modificação genética compreende uma modificação com uma ou mais das construções de ADN descritas acima ou aqui.

É também divulgada a utilização de uma construção de ADN isolada, para produzir um ratinho tal como aqui descrito. É igualmente divulgada a utilização de uma construção de ADN isolada como aqui descrita, num método para produzir uma proteína de ligação a antigénio.

É também divulgada uma célula-tronco não humana que compreende um vetor de direcionamento contendo uma construção de ADN como descrita acima e aqui. Uma célula-tronco não humana é também descrita, em que a célula-tronco não humana é derivada de um ratinho aqui descrito.

Num aspeto, a célula-tronco não humana é uma célula-tronco embrionária (CTE). Num aspeto específico, a célula CTE é uma célula CTE de ratinho.

É também descrita a utilização de uma célula-tronco não humana como aqui descrita, para produzir um ratinho conforme aqui descrito. A utilização de uma célula-tronco não humana como aqui descrita, para produzir uma proteína de ligação a antigénio é também descrita.

Um embrião de ratinho é também descrito, em que o embrião de ratinho compreende uma modificação genética tal como aqui divulgada. Num aspeto, é divulgado um embrião de ratinho hospedeiro que compreende uma célula CTE dadora, em que a

célula CTE dadora compreende uma modificação genética como aqui descrita. Num aspeto, o embrião de ratinho é um embrião pré-fase de mórula. Num aspeto específico, o embrião pré-fase de mórula é um embrião de 4 células ou um embrião de 8 células. Noutro aspeto específico, o embrião de ratinho é um blastocisto.

É também descrita a utilização de um embrião de ratinho como aqui descrito, para produzir um ratinho como aqui descrito. Num aspeto, é descrita a utilização de um embrião de ratinho como aqui descrito para produzir uma proteína de ligação a antigénio.

É igualmente descrita uma célula não humana, em que a célula não humana compreende uma sequência génica de cadeia leve de imunoglobulina rearranjada derivada de um ratinho geneticamente modificado como aqui descrito. Num aspeto, a célula é uma célula B. Num aspeto, a célula é um hibridoma. Num aspeto, a célula codifica um domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina e/ou um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina que é mutado somaticamente.

É igualmente descrita uma célula não humana, em que a célula não humana compreende uma sequência génica de cadeia leve de imunoglobulina rearranjada derivada de um ratinho geneticamente modificado como aqui descrito. Num aspeto, a célula é uma célula B. Num aspeto, a célula é um hibridoma. Num aspeto, a célula codifica um domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina e/ou um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina que é mutado somaticamente.

É também descrita a utilização de uma célula não humana como aqui descrita, para produzir um ratinho como aqui descrito. Num aspeto, é descrita a utilização de uma célula não humana como aqui descrita para produzir uma proteína de ligação a antigénio.

É também divulgada uma célula B de ratinho que expressa uma cadeia leve de imunoglobulina compreendendo (a) uma região variável derivada de um segmento génico hV λ e um segmento génico hJ λ ; e (b) um gene C_L de ratinho. Num aspeto, o gene C_L de ratinho é selecionado entre um gene C_k e um gene C λ . Num

aspecto específico, o gene $C\lambda$ é $C\lambda 2$. Num aspecto específico, o gene $C\lambda$ de ratinho é derivado de um gene $C\lambda$ que é pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% idêntico a $C\lambda 2$ de ratinho. Num aspecto, a célula B de ratinho expressa adicionalmente uma cadeia pesada cognata que compreende (c) uma região variável derivada de um hV_H , um hD_H e (d) um segmento hJ_H . Num aspecto, a célula B não compreende um gene λ rearranjado. Noutro aspecto, a célula B não compreende um gene κ rearranjado.

É igualmente divulgado um método para produzir um anticorpo num ratinho geneticamente modificado, que compreende: (a) expor um ratinho geneticamente modificado a um antigénio, em que o ratinho possui um genoma compreendendo pelo menos um $hV\lambda$ e pelo menos um $hJ\lambda$ num locus endógeno de cadeia leve, onde o locus endógeno de cadeia leve compreende um gene C_L de ratinho; (b) permitir que o ratinho geneticamente modificado desenvolva uma resposta imune ao antigénio; e (c) isolar a partir do ratinho de (b) um anticorpo que reconhece especificamente o antigénio, ou isolar a partir do ratinho de (b) uma célula compreendendo um domínio de imunoglobulina que reconhece especificamente o antigénio, onde o anticorpo compreende uma cadeia leve derivada de um $hV\lambda$, um $hJ\lambda$ e um gene C_L de ratinho. Num aspecto específico, o gene C_L de ratinho é um gene $C\kappa$ de ratinho.

Num aspecto, um método para produzir um anticorpo num ratinho geneticamente modificado, que compreende: (a) expor um ratinho geneticamente modificado a um antigénio, em que o ratinho possui um genoma compreendendo pelo menos um $hV\lambda$ num locus κ endógeno e pelo menos um $hJ\lambda$ no locus κ , onde o locus κ compreende um gene $C\kappa$ de ratinho; (b) permitir que o ratinho geneticamente modificado desenvolva uma resposta imune ao antigénio; e (c) isolar a partir do ratinho de (b) um anticorpo que reconhece especificamente o antigénio, ou isolar a partir do ratinho de (b) uma célula compreendendo um domínio de imunoglobulina que reconhece especificamente o antigénio, onde o anticorpo compreende uma cadeia leve derivada de um $hV\lambda$, um $hJ\lambda$ e um gene $C\kappa$ de ratinho.

Num aspecto, é divulgado um método para produzir um anticorpo num ratinho geneticamente modificado, que

compreende: (a) expor um ratinho geneticamente modificado a um antigénio, em que o ratinho possui um genoma compreendendo pelo menos um hV λ num locus λ de cadeia leve e pelo menos um J λ no locus λ de cadeia leve, onde o locus λ de cadeia leve compreende um gene C λ de ratinho; (b) permitir que o ratinho geneticamente modificado desenvolva uma resposta imune ao antigénio; e (c) isolar a partir do ratinho de (b) um anticorpo que reconhece especificamente o antigénio, ou isolar a partir do ratinho de (b) uma célula compreendendo um domínio de imunoglobulina que reconhece especificamente o antigénio, ou identificar no ratinho de (b) uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um domínio variável de cadeia pesada e/ou cadeia leve que se liga ao antigénio, onde o anticorpo compreende uma cadeia leve derivada de um hV λ , um hJ λ e um gene C λ de ratinho.

Num aspeto, o gene de região constante de cadeia leve λ é selecionado entre um gene C λ humano e um gene C λ de ratinho. Num aspeto, o gene de região constante de cadeia leve λ é um gene C λ humano. Num aspeto específico, o gene C λ humano é selecionado entre C λ 1, C λ 2, C λ 3 e C λ 7. Num aspeto, o gene de região constante de cadeia leve λ é um gene C λ de ratinho. Num aspeto específico, o gene C λ de ratinho é selecionado entre C λ 1, C λ 2 e C λ 3. Num aspeto mais específico, o gene C λ de ratinho é C λ 2. Noutro aspeto específico, o gene C λ de ratinho é derivado de um gene C λ que é pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% idêntico a C λ 2 de ratinho.

É também divulgado um método para produzir um gene de anticorpo rearranjado num ratinho geneticamente modificado, que compreende: (a) expor um ratinho geneticamente modificado a um antigénio, em que a modificação genética compreende um hV λ e um hJ λ num locus endógeno de cadeia leve, onde o locus endógeno de cadeia leve compreende um gene C λ de ratinho ou um seu fragmento funcional; e (b) identificar um gene de imunoglobulina rearranjado no referido ratinho, em que o gene de imunoglobulina rearranjado compreende um segmento génico de região variável de cadeia leve λ e um gene C λ ou um seu fragmento funcional.

Num aspeto, o método compreende ainda clonar uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma região variável de cadeia

pesada e/ou cadeia leve do ratinho, em que a região variável de cadeia pesada e/ou cadeia leve é de um anticorpo que compreende um V λ humano e um C λ de ratinho.

Num aspeto, o gene C λ de ratinho ou seu fragmento funcional é selecionado entre um gene C λ humano e um gene C λ de ratinho, ou um seu fragmento funcional.

Num aspeto, é divulgado um método para produzir um gene de anticorpo rearranjado num ratinho geneticamente modificado, que compreende: (a) expor um ratinho geneticamente modificado a um antigénio, em que a modificação genética compreende um hV λ e um hJ λ num locus κ de cadeia leve, onde o locus κ de cadeia leve compreende um gene C κ de ratinho ou um seu fragmento funcional; e (b) identificar um gene de imunoglobulina rearranjado no referido ratinho, em que o gene de imunoglobulina rearranjado compreende um segmento génico de região variável de cadeia leve λ e um gene C κ ou um seu fragmento funcional.

Num aspeto, o gene de região constante de cadeia leve κ ou seu fragmento funcional é selecionado entre um gene C κ humano e um gene C κ de ratinho, ou um seu fragmento funcional.

Num aspeto, o método compreende ainda clonar uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma região variável de cadeia pesada e/ou cadeia leve do ratinho, em que a região variável de cadeia pesada e/ou cadeia leve é de um anticorpo que compreende um V λ humano e um C κ de ratinho.

Num aspeto, é divulgado um método para produzir um gene de anticorpo rearranjado num ratinho geneticamente modificado, que compreende: (a) expor um ratinho geneticamente modificado a um antigénio, em que a modificação genética compreende um hV λ e um hJ λ num locus λ de cadeia leve de ratinho, onde o locus λ de cadeia leve compreende um gene C λ de ratinho ou um seu fragmento funcional; e (b) identificar um gene de imunoglobulina rearranjado no referido ratinho, em que o gene de imunoglobulina rearranjado compreende um segmento génico de região variável de cadeia leve λ e um gene C λ ou um seu fragmento funcional.

Num aspeto, o gene de região constante de cadeia leve λ ou seu fragmento funcional é selecionado entre um gene $C\lambda$ humano e um gene $C\lambda$ de ratinho, ou um seu fragmento funcional. Num aspeto específico, o gene de região constante de cadeia leve λ é um gene $C\lambda$ de ratinho ou um seu fragmento funcional.

Num aspeto, o método compreende ainda clonar uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma região variável de cadeia pesada e/ou cadeia leve do ratinho, em que a região variável de cadeia pesada e/ou cadeia leve é de um anticorpo que compreende um $V\lambda$ humano e um $C\lambda$ de ratinho.

É igualmente descrito um método para produzir um anticorpo, que compreende expor um ratinho como aqui descrito a um antigénio, permitir que o ratinho desenvolva uma resposta imune que compreende produzir um anticorpo que se liga especificamente ao antigénio, identificar uma sequência de ácidos nucleicos rearranjada no ratinho que codifica uma cadeia pesada e uma sequência de ácidos nucleicos rearranjada no ratinho que codifica uma sequência de domínio variável de cadeia leve cognata de um anticorpo, em que o anticorpo se liga especificamente ao antigénio, e utilizar as sequências de ácidos nucleicos dos domínios variáveis de cadeia pesada e cadeia leve fundidas com domínios constantes humanos para produzir um anticorpo desejado, em que o anticorpo desejado compreende uma cadeia leve que compreende um domínio $V\lambda$ fundido com um domínio C_L . Num aspeto, o domínio $V\lambda$ é humano e o domínio C_L é um domínio $C\lambda$ humano ou de ratinho. Num aspeto, o domínio $V\lambda$ é de ratinho e o domínio C_L é um domínio C_k humano ou de ratinho.

Num aspeto, é descrito um método para produzir um anticorpo, que compreende expor um ratinho como aqui descrito a um antigénio, permitir que o ratinho desenvolva uma resposta imune que compreende produzir um anticorpo que se liga especificamente ao antigénio, identificar uma sequência de ácidos nucleicos rearranjada no ratinho que codifica uma cadeia pesada e uma sequência de ácidos nucleicos rearranjada no ratinho que codifica uma sequência de domínio variável de cadeia leve cognata de um anticorpo, em que o anticorpo se liga especificamente ao antigénio, e utilizar as sequências de ácidos nucleicos dos domínios variáveis de cadeia pesada e

cadeia leve fundidas com sequências de ácidos nucleicos de domínios constantes humanos para produzir um anticorpo desejado, em que o anticorpo desejado compreende uma cadeia leve que compreende um domínio V λ fundido com um domínio C κ .

Num aspeto, é descrito um método para produzir um anticorpo, que compreende expor um ratinho como aqui descrito a um antigénio, permitir que o ratinho desenvolva uma resposta imune que compreende produzir um anticorpo que se liga especificamente ao antigénio, identificar uma sequência de ácidos nucleicos rearranjada no ratinho que codifica um domínio variável de cadeia pesada e uma sequência de ácidos nucleicos rearranjada que codifica uma sequência de domínio variável de cadeia leve cognata de um anticorpo, em que o anticorpo se liga especificamente ao antigénio, e utilizar as sequências de ácidos nucleicos fundidas com sequências de ácidos nucleicos que codificam um domínio constante de cadeia pesada humana e um domínio constante de cadeia leve humana para produzir um anticorpo derivado de sequências humanas, em que o anticorpo que se liga especificamente ao antigénio compreende uma cadeia leve que compreende um domínio V λ humano fundido com uma região C λ de ratinho.

Num aspeto, a região C λ de ratinho é selecionada entre C λ 1, C λ 2 e C λ 3. Num aspeto específico, a região C λ de ratinho é C λ 2.

Num aspeto, é descrito um método para produzir uma sequência génica de região variável de cadeia leve de anticorpo rearranjada, que compreende (a) expor um ratinho como aqui descrito a um antigénio; (b) permitir que o ratinho desenvolva uma resposta imune; (c) identificar uma célula no ratinho que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma sequência de domínio V λ humano rearranjada fundida com um domínio C λ de ratinho, em que a célula também codifica uma cadeia pesada cognata compreendendo um domínio V μ humano e um domínio C μ de ratinho, e em que a célula expressa um anticorpo que se liga ao antigénio; (d) clonar a partir da célula uma sequência de ácidos nucleicos que codifica o domínio V λ humano e uma sequência de ácidos nucleicos que codifica o domínio V μ humano cognato; e (e) utilizar a sequência de ácidos nucleicos clonada que codifica o domínio V λ humano e a sequência de

ácidos nucleicos clonada que codifica o domínio V_H humano cognato para produzir um anticorpo totalmente humano.

Num aspeto, é descrito um método para produzir uma sequência génica de região variável de cadeia leve de anticorpo rearranjada, que compreende (a) expor um ratinho como descrito nesta divulgação a um antigénio; (b) permitir que o ratinho desenvolva uma resposta imune; (c) identificar uma célula no ratinho que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma sequência de domínio $V\lambda$ humano rearranjada contígua, na mesma molécula de ácidos nucleicos, a uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um domínio C_k de ratinho, em que a célula também codifica uma cadeia pesada cognata compreendendo um domínio V_H humano e um domínio C_H de ratinho, e em que a célula expressa um anticorpo que se liga ao antigénio; (d) clonar a partir da célula uma sequência de ácidos nucleicos que codifica o domínio $V\lambda$ humano e uma sequência de ácidos nucleicos que codifica o domínio V_H humano cognato; e (e) utilizar a sequência de ácidos nucleicos clonada que codifica o domínio $V\lambda$ humano e a sequência de ácidos nucleicos clonada que codifica o domínio V_H humano cognato para produzir um anticorpo totalmente humano.

Num aspeto, é descrito um método para produzir uma sequência génica de região variável de cadeia leve de anticorpo rearranjada, que compreende (a) expor um ratinho como aqui descrito a um antigénio; (b) permitir que o ratinho desenvolva uma resposta imune ao antigénio; (c) identificar uma célula no ratinho que compreende ADN que codifica uma sequência de domínio $V\lambda$ humano rearranjada fundida com um domínio $C\lambda$ de ratinho, em que a célula também codifica uma cadeia pesada cognata compreendendo um domínio V_H humano e um domínio C_H de ratinho, e em que a célula expressa um anticorpo que se liga ao antigénio; (d) clonar a partir da célula uma sequência de ácidos nucleicos que codifica o domínio $V\lambda$ humano rearranjado e uma sequência de ácidos nucleicos que codifica o domínio V_H humano cognato; e (e) utilizar a sequência de ácidos nucleicos clonada que codifica o domínio $V\lambda$ humano e a sequência de ácidos nucleicos clonada que codifica o domínio V_H humano cognato para produzir um anticorpo totalmente humano. Num aspeto, o domínio $C\lambda$ de ratinho é $C\lambda 2$ de ratinho. Num aspeto específico, o domínio $C\lambda$ de ratinho é derivado de um gene $C\lambda$

que é pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% idêntico a C λ 2 de ratinho.

É igualmente divulgado um ratinho geneticamente modificado que expressa uma cadeia leve derivada de λ humana fundida com uma região constante de cadeia leve endógena (C_L), em que o ratinho, ao ser imunizado com antigénio, produz um anticorpo compreendendo um domínio V λ humano fundido com um domínio C_L de ratinho. Num aspeto, o domínio C_L de ratinho é selecionado entre um domínio C κ e um domínio C λ . Num aspeto, o domínio C_L de ratinho é um domínio C κ . Num aspeto, o domínio C_L de ratinho é um domínio C λ . Num aspeto específico, o domínio C λ é C λ 2. Num aspeto específico, o domínio C λ de ratinho é derivado de um gene C λ que é pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% idêntico a C λ 2 de ratinho.

É também descrito um ratinho geneticamente modificado compreendendo um locus κ ou λ endógeno de cadeia leve modificado como aqui descrito, que expressa uma pluralidade de cadeias leves λ de imunoglobulina associadas a uma pluralidade de cadeias pesadas de imunoglobulina. Num aspeto, a cadeia pesada compreende uma sequência humana. Em vários aspetos, a sequência humana é selecionada entre uma sequência variável, uma C_H1, uma dobradiça, uma C_H2, uma C_H3 e uma sua combinação. Num aspeto, a pluralidade de cadeias leves λ de imunoglobulina compreende uma sequência humana. Em vários aspetos, a sequência humana é selecionada entre uma sequência variável, uma sequência constante e uma sua combinação. Num aspeto, o ratinho compreende um locus endógeno de imunoglobulina desativado e expressa a cadeia pesada e/ou a cadeia leve λ a partir de um transgene ou epissoma extracromossómico. Num aspeto, o ratinho compreende uma substituição, ao nível de um locus endógeno de ratinho, de alguns ou todos os segmentos génicos de cadeia pesada endógenos de ratinho (isto é, V, D, J) e/ou de algumas ou todas as sequências constantes de cadeia pesada endógenas de ratinho (por exemplo, C_H1, dobradiça, C_H2, C_H3 ou uma sua combinação) e/ou de algumas ou todas as sequências de cadeia leve endógenas de ratinho (por exemplo, V, J, constante ou uma sua combinação) por uma ou mais sequências de imunoglobulina humana.

É também divulgado um ratinho adequado para produzir anticorpos que possuem uma cadeia leve derivada de λ humana, em que a totalidade ou quase totalidade dos anticorpos produzidos no ratinho são expressos com uma cadeia leve derivada de λ humana. Num aspeto, a cadeia leve derivada de λ humana é expressa a partir de um locus endógeno de cadeia leve. Num aspeto, o locus endógeno de cadeia leve é um locus κ de cadeia leve. Num aspeto específico, o locus κ de cadeia leve é um locus κ de cadeia leve de ratinho.

É igualmente descrito um método de produção de uma cadeia leve derivada de λ para um anticorpo humano, compreendendo obter de um ratinho como aqui descrito uma sequência de cadeia leve e uma sequência de cadeia pesada, e utilizar a sequência de cadeia leve e a sequência de cadeia pesada na produção de um anticorpo humano.

É também descrito um método para produzir uma proteína de ligação a antigénio, compreendendo expor um ratinho como aqui descrito a um antigénio; permitir que o ratinho desenvolva uma resposta imune; e obter do ratinho uma proteína de ligação a antigénio que se liga ao antigénio, ou obter do ratinho uma sequência que será utilizada na produção de uma proteína de ligação a antigénio que se liga ao antigénio.

Uma célula derivada de um ratinho como aqui descrito é também divulgada. Num aspeto, a célula é selecionada entre uma célula-tronco embrionária, uma célula pluripotente, uma célula pluripotente induzida, uma célula B e um hibridoma.

Uma célula que compreende uma modificação genética como aqui descrita é também divulgada. Num aspeto, a célula é uma célula de ratinho. Num aspeto, a célula é selecionada entre um hibridoma e um quadroma. Num aspeto, a célula expressa uma cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma sequência variável λ humana fundida com uma sequência constante de ratinho. Num aspeto específico, a sequência constante de ratinho é uma sequência constante κ de ratinho.

Um tecido derivado de um ratinho como aqui descrito é também divulgado.

A utilização de um ratinho ou de uma célula como aqui descritos para produzir uma proteína de ligação a antígeno é também divulgada. Num aspeto, a proteína de ligação a antígeno é uma proteína humana. Num aspeto, a proteína humana é um anticorpo humano.

Uma proteína de ligação a antígeno produzida por um ratinho, uma célula, um tecido ou um método como aqui descritos é igualmente divulgada. Num aspeto, a proteína de ligação a antígeno é uma proteína humana. Num aspeto, a proteína humana é um anticorpo humano.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A FIG. 1 mostra uma ilustração detalhada, sem estar à escala, do locus λ de cadeia leve humano, incluindo os clusters dos segmentos génicos $V\lambda$ (A, B e C) e os pares das regiões $J\lambda$ e $C\lambda$ (pares J-C).

A FIG. 2 apresenta uma ilustração geral, sem estar à escala, de uma estratégia de direcionamento usada para inativar o locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho.

A FIG. 3 apresenta uma ilustração geral, sem estar à escala, de uma estratégia de direcionamento usada para inativar o locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho.

A FIG. 4A apresenta uma ilustração geral, sem estar à escala, de um vetor de direcionamento inicial para visar o locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho com sequências de cadeia leve λ humana, incluindo 12 segmentos génicos $hV\lambda$ e o segmento génico $hJ\lambda 1$ (vetor de direcionamento 12/1- λ).

A FIG. 4B apresenta uma ilustração geral, sem estar à escala, de quatro vetores de direcionamento iniciais para visar o locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho com sequências de cadeia leve λ humana, incluindo 12 segmentos génicos $hV\lambda$ e o segmento génico $hJ\lambda 1$ (vetor de direcionamento 12/1- κ), 12 segmentos génicos $hV\lambda$ e os segmentos génicos $hJ\lambda 1$, 2, 3 e 7 (vetor de direcionamento 12/4- κ), 12 segmentos génicos $hV\lambda$, uma sequência genómica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana e o segmento génico $hJ\lambda 1$ (vetor de direcionamento 12(κ)1- κ) e 12 segmentos génicos $hV\lambda$,

uma sequência genómica V κ -J κ humana e os segmentos génicos hJ λ 1, 2, 3 e 7 (vetor de direcionamento 12(κ)4- κ).

A FIG. 5A apresenta uma ilustração geral, sem estar à escala, de uma estratégia de direcionamento para a introdução progressiva de 40 segmentos génicos hV λ e um único segmento génico hJ λ no locus λ de cadeia leve de ratinho.

A FIG. 5B apresenta uma ilustração geral, sem estar à escala, de uma estratégia de direcionamento para a introdução progressiva de 40 segmentos génicos hV λ e um único segmento génico hJ λ no locus κ de ratinho.

A FIG. 6 apresenta uma ilustração geral, sem estar à escala, dos passos de direcionamento e engenharia molecular empregues para produzir vetores de direcionamento λ - κ híbridos humanos para a construção de um locus híbrido de cadeia leve contendo uma sequência intergénica κ humana, múltiplos segmentos génicos hJ λ ou ambos.

A FIG. 7A apresenta uma ilustração geral, sem estar à escala, da estrutura do locus para um locus λ de cadeia leve de ratinho modificado, contendo 40 segmentos génicos hV λ e um único segmento génico hJ λ ligados funcionalmente ao gene C λ 2 endógeno.

A FIG. 7B apresenta uma ilustração geral, sem estar à escala, da estrutura do locus para quatro loci κ de cadeia leve de ratinho modificados e independentes, contendo 40 segmentos génicos hV λ e um ou quatro segmentos génicos hJ λ , com ou sem uma sequência genómica V κ -J κ humana contígua, ligados funcionalmente ao gene C κ endógeno.

A FIG. 8A mostra os gráficos de contorno de esplenócitos Ig λ ⁺ e Ig κ ⁺ delimitados para CD19⁺ de um ratinho de tipo selvagem (WT), um ratinho homozigótico para 12 hV λ e quatro segmentos génicos hJ λ que inclui uma sequência genómica V κ -J κ humana (12hV λ -V κ J κ -4hJ λ), e um ratinho homozigótico para 40 hV λ e um segmento génico hJ λ (40hV λ -1hJ λ).

A FIG. 8B mostra o número total de células B CD19⁺ em baços colhidos de ratinhos de tipo selvagem (WT), ratinhos

homozigóticos para 12 hV λ e quatro segmentos gênicos hJ λ que incluem uma sequência genômica V κ -J κ humana (12hV λ -V κ J κ -4hJ λ), e ratinhos homozigóticos para 40 hV λ e um segmento gênico hJ λ (40hV λ -1hJ λ).

A FIG. 9A, no painel superior, ilustra os gráficos de contorno de esplenócitos com delimitação de singletos e corados em termos de células B e T (CD19⁺ e CD3⁺, respetivamente) de um ratinho de tipo selvagem (WT) e de um ratinho homozigótico para 40 hV λ e quatro segmentos gênicos J λ que inclui uma sequência genômica V κ -J κ humana (40hV λ -V κ J κ -4hJ λ). O painel inferior mostra os gráficos de contorno de esplenócitos delimitados para CD19⁺ e corados em termos de expressão de Ig λ ⁺ e Ig κ ⁺ de um ratinho de tipo selvagem (WT) e de um ratinho homozigótico para 40 hV λ e quatro segmentos gênicos J λ que inclui uma sequência genômica V κ -J κ humana (40hV λ -V κ J κ -4hJ λ).

A FIG. 9B mostra o número total de células B CD19⁺, CD19⁺Ig κ ⁺ e CD19⁺Ig λ ⁺ em baços colhidos de ratinhos de tipo selvagem (WT) e de ratinhos homozigóticos para 40 hV λ e quatro segmentos gênicos J λ que incluem uma sequência genômica V κ -J κ humana (40hV λ -V κ J κ -4hJ λ).

A FIG. 9C mostra os gráficos de contorno de esplenócitos delimitados para CD19⁺ e corados em termos de imunoglobulina D (IgD) e imunoglobulina M (IgM) de um ratinho de tipo selvagem (WT) e de um ratinho homozigótico para 40 hV λ e quatro segmentos gênicos J λ que inclui uma sequência genômica V κ -J κ humana (40hV λ -V κ J κ -4hJ λ). As células B maduras (72 para WT, 51 para 40hV λ -V κ J κ -4hJ λ) e transicionais (13 para WT, 22 para 40hV λ -V κ J κ -4hJ λ) estão assinaladas em cada um dos gráficos de contorno.

A FIG. 9D mostra o número total de células B CD19⁺, células B transicionais (CD19⁺IgM^{hi}IgD^{lo}) e células B maduras (CD19⁺IgM^{lo}IgD^{hi}) em baços colhidos de ratinhos de tipo selvagem (WT) e de ratinhos homozigóticos para 40 hV λ e quatro segmentos gênicos J λ que incluem uma sequência genômica V κ -J κ humana (40hV λ -V κ J κ -4hJ λ).

A FIG. 10A, no painel superior, ilustra os gráficos de contorno de medula óssea corada em termos de células B e T

(CD19⁺ e CD3⁺, respetivamente) de um ratinho de tipo selvagem (WT) e de um ratinho homozigótico para 40 hV λ e quatro segmentos génicos J λ que inclui uma sequência genómica V κ -J κ humana (40hV λ -V κ J κ -4hJ λ). O painel inferior mostra os gráficos de contorno de medula óssea delimitada para CD19⁺ e corada em termos de ckit⁺ e CD43⁺ de um ratinho de tipo selvagem (WT) e de um ratinho homozigótico para 40 hV λ e quatro segmentos génicos J λ que inclui uma sequência genómica V κ -J κ humana (40hV λ -V κ J κ -4hJ λ). As células pró-B e pré-B estão assinaladas nos gráficos de contorno do painel inferior.

A FIG. 10B mostra o número de células pró-B (CD19⁺CD43⁺ckit⁺) e pré-B (CD19⁺CD43⁻ckit⁻) na medula óssea colhida dos fémures de ratinhos de tipo selvagem (WT) e de ratinhos homozigóticos para 40 hV λ e quatro segmentos génicos J λ que incluem uma sequência genómica V κ -J κ humana (40hV λ -V κ J κ -4hJ λ).

A FIG. 10C ilustra os gráficos de contorno de medula óssea com delimitação de singletos e corada em termos de imunoglobulina M (IgM) e B220 de um ratinho de tipo selvagem (WT) e de um ratinho homozigótico para 40 hV λ e quatro segmentos génicos J λ que inclui uma sequência genómica V κ -J κ humana (40hV λ -V κ J κ -4hJ λ). As células B imaturas, maduras e pró/pré-B estão assinaladas em cada um dos gráficos de contorno.

A FIG. 10D mostra o número total de células B imaturas (B220^{int}IgM⁺) e maduras (B220^{hi}IgM⁺) na medula óssea isolada dos fémures de ratinhos de tipo selvagem (WT) e de ratinhos homozigóticos para 40 hV λ e quatro segmentos génicos J λ que incluem uma sequência genómica V κ -J κ humana (40hV λ -V κ J κ -4hJ λ).

A FIG. 10E ilustra os gráficos de contorno de medula óssea delimitada para células B imaturas (B220^{int}IgM⁺) e maduras (B220^{hi}IgM⁺) e corada em termos de expressão de Ig λ e Ig κ , isolada dos fémures de um ratinho de tipo selvagem (WT) e de um ratinho homozigótico para 40 hV λ e quatro segmentos génicos J λ que inclui uma sequência genómica V κ -J κ humana (40hV λ -V κ J κ -4hJ λ).

A FIG. 11 mostra um alinhamento das sequências nucleotídicas da junção V λ -J λ -C κ de dezoito clones independentes, amplificados por RT-PCR a partir do ARN de esplenócitos de ratinhos portadores de sequências génicas de cadeia leve λ humana ao nível de um locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho. A6 = SEQ ID NO:57; B6 = SEQ ID NO:58; F6 = SEQ ID NO:59; B7 = SEQ ID NO:60; E7 = SEQ ID NO:61; F7 = SEQ ID NO:62; C8 = SEQ ID NO:63; E12 = SEQ ID NO:64; 1-4 = SEQ ID NO:65; 1-20 = SEQ ID NO:66; 3B43 = SEQ ID NO:67; 5-8 = SEQ ID NO:68; 5-19 = SEQ ID NO:69; 1010 = SEQ ID NO:70; 11A1 = SEQ ID NO:71; 7A8 = SEQ ID NO:72; 3A3 = SEQ ID NO:73; 2-7 = SEQ ID NO:74. As bases em letra minúscula indicam bases que não são da linha germinal e resultam ou de mutação e/ou de adição N durante a recombinação. Os aminoácidos consenso dentro da região *framework* 4 (FWR4) codificados pela sequência nucleotídica de hJ λ 1 e C κ de ratinho estão indicados no final do alinhamento das sequências.

A FIG. 12 mostra um alinhamento das sequências nucleotídicas da junção V λ -J λ -C κ de doze clones independentes, amplificados por RT-PCR a partir do ARN de esplenócitos de ratinhos portadores de sequências génicas de cadeia leve λ humana e de uma sequência genómica V κ -J κ humana contígua ao nível de um locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho. 5-2 = SEQ ID NO:87; 2-5 = SEQ ID NO:88; 1-3 = SEQ ID NO:89; 4B-1 = SEQ ID NO:90; 3B-5 = SEQ ID NO:91; 7A-1 = SEQ ID NO:92; 5-1 = SEQ ID NO:93; 4A-1 = SEQ ID NO:94; 11A-1 = SEQ ID NO:95; 5-7 = SEQ ID NO:96; 5-4 = SEQ ID NO:97; 2-3 = SEQ ID NO:98. As bases em letra minúscula indicam bases que não são da linha germinal e resultam ou de mutação e/ou de adição N durante a recombinação. Os aminoácidos consenso dentro da região *framework* 4 (FWR4) codificados pela sequência nucleotídica de cada J λ humano e C κ de ratinho estão indicados no final do alinhamento das sequências.

A FIG. 13 mostra um alinhamento das sequências nucleotídicas da junção V λ -J λ -C κ de três clones independentes, amplificados por RT-PCR a partir do ARN de esplenócitos de ratinhos portadores de sequências génicas de cadeia leve λ humana ao nível de um locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho. 2D1 = SEQ ID NO:101; 2D9 = SEQ ID NO:102; 3E15 = SEQ ID NO:103. As bases em letra minúscula indicam bases que não

são da linha germinal e resultam ou de mutação e/ou de adição N durante a recombinação. Os aminoácidos consenso dentro da região *framework* 4 (FWR4) codificados pela sequência nucleotídica de hJ λ 1 e C λ 2 de ratinho estão indicados no final do alinhamento das sequências.

DESCRIÇÃO DETALHADA

O invento no seu sentido mais amplo é tal como definido nas reivindicações independentes.

O termo "contíguo" inclui a referência a uma ocorrência na mesma molécula de ácidos nucleicos, por exemplo, duas sequências de ácidos nucleicos são "contíguas" se existirem na mesma molécula de ácidos nucleicos, mas estiverem interrompidas por outra sequência de ácidos nucleicos. Por exemplo, uma sequência V(D)J rearranjada é "contígua" a uma sequência génica de região constante, embora o codão final da sequência V(D)J não seja imediatamente seguido pelo primeiro codão da sequência de região constante. Noutro exemplo, duas sequências génicas de segmento V são "contíguas" se existirem no mesmo fragmento genómico, embora possam estar separadas por uma sequência que não codifica um codão da região V, por exemplo, poderão estar separadas por uma sequência reguladora, por exemplo, um promotor ou outra sequência não codificante. Numa concretização, uma sequência contígua inclui um fragmento genómico que contém as sequências genómicas dispostas tal como encontradas num genoma de tipo selvagem.

A frase "derivada de" quando usada em relação a uma região variável "derivada de" um gene ou segmento génico citado inclui a capacidade de rastrear a sequência até um determinado segmento génico ou segmentos génicos não rearranjados, que foram rearranjados para formar um gene que expressa o domínio variável (explicando, quando aplicável, diferenças de *splicing* e mutações somáticas).

A frase "funcional" quando utilizada em relação a um segmento génico de região variável ou um segmento génico de junção refere-se à utilização num repertório de anticorpos expressos; por exemplo, nos seres humanos, os segmentos génicos

V λ 3-1, 4-3, 2-8, etc. são funcionais, enquanto os segmentos génicos V λ 3-2, 3-4, 2-5, etc. são não funcionais.

Um "locus de cadeia pesada" inclui uma localização num cromossoma, por exemplo, um cromossoma de ratinho, onde, num ratinho de tipo selvagem, se encontram as sequências de ADN da região variável de cadeia pesada (V_H), região de diversidade de cadeia pesada (D_H), região de junção de cadeia pesada (J_H) e região constante de cadeia pesada (C_H).

Um "locus κ " inclui uma localização num cromossoma, por exemplo, um cromossoma de ratinho, onde, num ratinho de tipo selvagem, se encontram as sequências de ADN da região variável κ (V κ), região de junção κ (J κ) e região constante κ (C κ).

Um "locus λ " inclui uma localização num cromossoma, por exemplo, um cromossoma de ratinho, onde, num ratinho de tipo selvagem, se encontram as sequências de ADN da região variável λ (V λ), região de junção λ (J λ) e região constante λ (C λ).

O termo "não rearranjado" inclui o estado de um locus de imunoglobulina em que os segmentos génicos V e os segmentos génicos J (para as cadeias pesadas, também os segmentos génicos D) são mantidos separados, mas podem ser unidos para formar um gene V(D)J rearranjado que compreende um único V, (D), J do repertório V(D)J.

Ratinhos que expressam domínios variáveis λ humanos

Os ratinhos que expressam anticorpos totalmente humanos, ou parcialmente humanos e parcialmente de ratinho, já foram previamente referidos. Os ratinhos geneticamente manipulados VELOCIMMUNE® compreendem uma substituição dos segmentos génicos V(D)J não rearranjados nos loci endógenos de ratinho por segmentos génicos V(D)J humanos. Os ratinhos VELOCIMMUNE® expressam anticorpos quiméricos possuindo domínios variáveis humanos e domínios constantes de ratinho (ver, por exemplo, patente U.S. n.º 7,605,237). A maior parte das outras comunicações referem-se a ratinhos que expressam anticorpos totalmente humanos a partir de transgenes totalmente humanos, em ratinhos com loci endógenos de imunoglobulina desativados.

As cadeias leves dos anticorpos são codificadas por um de dois loci separados: kappa (κ) e lambda (λ). As cadeias leves dos anticorpos de ratinho são essencialmente do tipo κ . Os ratinhos que produzem anticorpos de ratinho, e os ratinhos modificados que produzem anticorpos totalmente humanos ou anticorpos quiméricos humano-ratinho, mostram uma parcialidade na utilização das cadeias leves. Os seres humanos também exibem uma parcialidade relativamente às cadeias leves, embora não tão pronunciada como nos ratinhos; a razão de utilização de cadeias leves κ para cadeias leves λ nos ratinhos é de cerca de 95:5, enquanto nos seres humanos essa razão é de cerca de 60:40. Não se crê que a parcialidade mais pronunciada nos ratinhos afete gravemente a diversidade de anticorpos, uma vez que o locus λ variável nos ratinhos não é assim tão diverso à partida. Esse não é o caso nos seres humanos. O locus λ de cadeia leve humano é extremamente diverso.

O locus λ de cadeia leve humano prolonga-se por mais de 1000 kb e contém mais de 80 genes que codificam os segmentos variáveis (V) ou de junção (J) (FIG. 1). No locus λ de cadeia leve humano, mais de metade de todos os domínios $V\lambda$ observados são codificados pelos segmentos génicos 1-40, 1-44, 2-8, 2-14 e 3-21. No geral, crê-se que cerca de 30 dos segmentos génicos $V\lambda$ humanos sejam funcionais. Há sete segmentos génicos $J\lambda$, em que apenas quatro deles são considerados segmentos génicos $J\lambda$ geralmente funcionais - $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$ e $J\lambda 7$.

O locus λ de cadeia leve nos seres humanos é semelhante em termos de estrutura ao locus κ tanto dos ratinhos como dos seres humanos, no sentido em que o locus λ de cadeia leve humano possui vários segmentos génicos de região variável que são capazes de sofrer recombinação para formar uma proteína de cadeia leve funcional. O locus λ de cadeia leve humano contém aproximadamente 70 segmentos génicos V e 7 pares de segmentos génicos $J\lambda$ - $C\lambda$. Apenas quatro destes pares de segmentos génicos $J\lambda$ - $C\lambda$ aparentam ser funcionais. Nalguns alelos, um quinto par de segmentos génicos $J\lambda$ - $C\lambda$ é aparentemente um pseudogene ($C\lambda 6$). Os 70 segmentos génicos $V\lambda$ parecem conter 38 segmentos génicos funcionais. As 70 sequências $V\lambda$ são dispostas em três clusters, em que todos eles contêm membros distintos dos diferentes grupos de famílias de genes V (clusters A, B e C; FIG. 1). Esta é uma fonte potencialmente rica e relativamente

inexplorada de diversidade para gerar anticorpos com regiões V humanas em animais não humanos.

Em contraste gritante, o locus λ de cadeia leve de ratinho contém apenas dois ou três (dependendo da estirpe) segmentos génicos de região V λ de ratinho (FIG. 2). Pelo menos por esta razão, não se pensa que a grande parcialidade pelas cadeias κ observada nos ratinhos seja particularmente prejudicial para a diversidade de anticorpos total.

De acordo com os mapas publicados do locus λ de cadeia leve de ratinho, o locus consiste essencialmente em dois clusters de segmentos génicos num trecho de aproximadamente 200 kb (FIG. 2). Os dois clusters contêm dois conjuntos de genes V, J e C que são capazes de rearranjo independente: V λ 2-J λ 2-C λ 2-J λ 4-C λ 4 e V λ 1-J λ 3-C λ 3-J λ 1-C λ 1. Embora se tenha constatado que V λ 2 se recombina com todos os segmentos génicos J λ , V λ 1 parece recombinar-se exclusivamente com C λ 1. Acredita-se que C λ 4 é um pseudogene com sítios de *splicing* defeituosos.

O locus κ de cadeia leve de ratinho é incontestavelmente diferente. A estrutura e o número de segmentos génicos que participam nos eventos de recombinação conducentes a uma proteína de cadeia leve funcional a partir do locus κ de ratinho é muito mais complexo (FIG. 3). Assim, as cadeias leves λ de ratinho não contribuem grandemente para a diversidade de uma população de anticorpos num ratinho típico.

A exploração da grande diversidade do locus λ de cadeia leve humano no ratinho provavelmente resultaria, entre outros aspetos, numa fonte para um repertório humano de domínios V de cadeia leve mais completo. As tentativas anteriores de exploração desta diversidade utilizaram transgenes humanos, contendo porções do locus λ de cadeia leve humano, incorporados aleatoriamente no genoma de ratinho (ver, por exemplo, US 6,998,514 e US 7,435,871). Os ratinhos contendo estes transgenes integrados de forma aleatória alegadamente expressam cadeias leves λ totalmente humanas. Contudo, em alguns casos, um ou ambos os loci endógenos de cadeia leve permanecem intactos. Esta situação não é desejável, pois as sequências de cadeia leve λ humanas competem com a cadeia leve

de ratinho (κ ou λ) no repertório de anticorpos expressos do ratinho.

Em contrapartida, os inventores descrevem ratinhos geneticamente modificados que são capazes de expressar uma ou mais sequências de ácidos nucleicos de cadeia leve λ diretamente a partir de um locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho. Os ratinhos geneticamente modificados capazes de expressar sequências de cadeia leve λ humanas a partir de um locus κ endógeno poderão ser cruzados com ratinhos que compreendem um locus de cadeia pesada humana, sendo, assim, usados para expressar anticorpos compreendendo regiões V (pesada e leve κ) que são totalmente humanas. As regiões V são expressas com regiões constantes de ratinho. Em vários aspetos, não estão presentes segmentos génicos endógenos de imunoglobulina de ratinho, e as regiões V são expressas com regiões constantes humanas. Estes anticorpos seriam úteis em numerosas aplicações, tanto diagnósticas como terapêuticas.

Vários aspetos da expressão de proteínas de ligação derivadas de segmentos génicos $V\lambda$ e $J\lambda$ humanos em ratinhos apresentam vantagens. As vantagens podem ser concretizadas colocando as sequências λ humanas num locus endógeno de cadeia leve, por exemplo, o locus κ ou λ de ratinho. Os anticorpos produzidos a partir destes ratinhos podem ter cadeias leves que compreendem domínios $V\lambda$ humanos fundidos com uma região $C\kappa$ de ratinho. Os ratinhos também expressam domínios $V\lambda$ humanos que são adequados para identificação e clonagem para uso com regiões C_L humanas, especificamente regiões $C\kappa$ e/ou $C\lambda$. Como o desenvolvimento das células B nestes ratinhos é de outro modo normal, é possível gerar domínios $V\lambda$ compatíveis (incluindo domínios $V\lambda$ mutados somaticamente) no contexto de regiões $C\lambda$ ou $C\kappa$.

São descritos ratinhos geneticamente modificados que compreendem um segmento génico $V\lambda$ humano não rearranjado e um $J\lambda$ humano não rearranjado num locus κ endógeno de cadeia leve de imunoglobulina. São descritos ratinhos que expressam anticorpos que compreendem uma cadeia leve possuindo um domínio $V\lambda$ humano fundido com uma região $C\kappa$.

Transcritos estéreis do locus κ de cadeia leve de imunoglobulina

As variações sobre o tema da expressão de sequências λ de imunoglobulina humana em ratinhos refletem-se em vários aspetos dos ratinhos geneticamente modificados capazes dessa expressão. Assim, em alguns aspetos, os ratinhos geneticamente modificados compreendem determinada(s) sequência(s) não codificante(s) de um locus humano. Num aspeto, o ratinho geneticamente modificado compreende segmentos génicos $V\lambda$ e $J\lambda$ humanos num locus κ endógeno de cadeia leve e compreende ainda um fragmento genómico de cadeia leve κ humana. Num aspeto específico, o fragmento genómico de cadeia leve κ humana é uma sequência não codificante encontrada naturalmente entre um segmento génico $V\kappa$ humano e um segmento génico $J\kappa$ humano.

Os loci κ de cadeia leve humano e de ratinho contêm sequências que codificam transcritos estéreis desprovidos quer de um codão de iniciação quer de uma grelha de leitura aberta e que são encarados como elementos que regulam a transcrição dos loci κ de cadeia leve. Estes transcritos estéreis resultam de uma sequência intergénica localizada a jusante ou em 3' do segmento génico $V\kappa$ mais proximal e a montante ou em 5' do amplificador intrónico κ ($E\kappa i$) que se encontra a montante do gene de região constante de cadeia leve κ ($C\kappa$). Os transcritos estéreis resultam do rearranjo da sequência intergénica para formar um segmento $V\kappa J\kappa 1$ fundido com um $C\kappa$.

Uma substituição do locus κ de cadeia leve a montante do gene $C\kappa$ removeria a região intergénica que codifica os transcritos estéreis. Assim, em vários aspetos, uma substituição da sequência de cadeia leve κ de ratinho a montante do gene $C\kappa$ de ratinho por segmentos génicos de cadeia leve λ humana resultaria num locus κ de cadeia leve de ratinho humanizado que contém segmentos génicos $V\lambda$ e $J\lambda$ humanos, mas não contém a região intergénica de cadeia leve κ que codifica os transcritos estéreis.

Tal como aqui descrito, a humanização do locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho com segmentos génicos de cadeia leve λ humana, em que a humanização remove a região intergénica, resulta numa queda dramática na utilização do locus κ de cadeia

leve, acoplada a um aumento acentuado na utilização da cadeia leve λ . Por conseguinte, embora um ratinho humanizado desprovido da região intergénica seja útil na medida em que pode produzir anticorpos com domínios variáveis de cadeia leve humana (por exemplo, domínios λ ou κ humanos), a utilização do locus diminui.

É também descrita a humanização do locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho com segmentos génicos $V\lambda$ e $J\lambda$ humanos, acoplados a uma inserção de uma região intergénica κ humana, para criar um locus $V\lambda$ que contém, relativamente à transcrição, entre o segmento génico $V\lambda$ humano final e o primeiro segmento génico $J\lambda$ humano, uma região intergénica κ , que exhibe uma população de células B com uma expressão mais elevada do que um locus desprovido da região intergénica κ . Esta observação é consistente com uma hipótese de que a região intergénica - diretamente através de um transcrito estéril ou indiretamente - suprime a utilização a partir do locus λ endógeno de cadeia leve. Com esta hipótese, a inclusão da região intergénica resultaria numa diminuição da utilização do locus λ endógeno de cadeia leve, deixando ao ratinho a escolha limitada de utilizar o locus modificado (λ em κ) para gerar anticorpos tal como exposto nas reivindicações.

Em vários aspetos, uma substituição da sequência de cadeia leve κ de ratinho, a montante do gene $C\kappa$ de ratinho, por uma sequência de cadeia leve λ humana compreende ainda uma região intergénica de cadeia leve κ humana disposta, relativamente à transcrição, entre a região 3' não traduzida do segmento génico $V\lambda$ mais 3' e 5' em relação ao primeiro segmento génico $J\lambda$ humano. Em alternativa, esta região intergénica poderá ser omitida de um locus κ endógeno de cadeia leve substituído (a montante do gene $C\kappa$ de ratinho) efetuando uma eliminação no locus λ endógeno de cadeia leve. Do mesmo modo, sob este aspeto, o ratinho produz anticorpos a partir de um locus κ endógeno de cadeia leve contendo sequências de cadeia leve λ humana tal como descrito nas reivindicações.

Abordagens de manipulação de ratinhos para expressar domínios V λ humanos

Descrevem-se várias abordagens para produzir ratinhos geneticamente modificados que produzem anticorpos contendo uma cadeia leve que tem um domínio V λ humano fundido com uma região C κ endógena. Descrevem-se modificações genéticas que, em vários aspetos, compreendem uma eliminação de um ou de ambos os loci endógenos de cadeia leve. Por exemplo, para eliminar as cadeias leves λ de ratinho do repertório de anticorpos endógenos, é possível efetuar uma eliminação de um primeiro cluster de genes V λ -J λ -C λ e a substituição, na totalidade ou em parte, dos segmentos génicos V λ -J λ de um segundo cluster de genes por segmentos génicos V λ -J λ humanos. Descrevem-se igualmente embriões de ratinho e células geneticamente modificados, assim como construções de direcionamento para produzir os ratinhos, os embriões de ratinho e as células.

A eliminação de um cluster de genes V λ -J λ -C λ endógenos e a substituição dos segmentos génicos V λ -J λ de outro cluster de genes V λ -J λ -C λ endógenos faz uso de uma perturbação relativamente pequena da associação e função da região constante dos anticorpos naturais no animal, em vários aspetos, porque os genes C λ endógenos são deixados intactos e, por conseguinte, retêm a sua funcionalidade normal e a capacidade de associação com a região constante de uma cadeia pesada endógena. Assim, nesses aspetos, a modificação não afeta outras regiões constantes de cadeia pesada endógenas que dependem de regiões constantes de cadeia leve funcionais para a montagem de uma molécula de anticorpo funcional contendo duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Além disso, em vários aspetos, a modificação não afeta a montagem de uma molécula de anticorpo funcional presa à membrana, envolvendo uma cadeia pesada endógena e uma cadeia leve, por exemplo, um domínio hV λ ligado a uma região C λ de ratinho. Como pelo menos um gene C λ funcional é retido no locus endógeno, os animais que contêm uma substituição dos segmentos génicos V λ -J λ de um cluster de genes V λ -J λ -C λ endógenos por segmentos génicos V λ -J λ humanos deverão conseguir produzir cadeias leves λ normais, que são capazes de se ligarem ao antígeno durante uma resposta imune através dos segmentos génicos V λ -J λ humanos presentes no repertório de anticorpos expressos do animal.

Uma ilustração esquemática (sem estar à escala) de um cluster de genes V λ -J λ -C λ endógenos de ratinho eliminado está apresentada na FIG. 2. Tal como ilustrado, o locus λ de cadeia leve de ratinho está organizado em dois clusters de genes, em que ambos contêm segmentos génicos funcionais capazes de sofrer recombinação para formar uma cadeia leve λ de ratinho funcional. O cluster de genes V λ 1-J λ 3-C λ 3-J λ 1-C λ 1 endógenos de ratinho é eliminado por uma construção de direcionamento (vetor de direcionamento 1) com uma cassette de neomicina flanqueada por sítios de recombinação. O outro cluster de genes endógenos (V λ 2-V λ 3-J λ 2-C λ 2-J λ 4-C λ 4) é parcialmente eliminado por uma construção de direcionamento (vetor de direcionamento 2) com uma cassette de higromicina-timidina-cinase flanqueada por sítios de recombinação. Neste segundo evento de direcionamento, os segmentos génicos endógenos C λ 2-J λ 4-C λ 4 são conservados. A segunda construção de direcionamento (vetor de direcionamento 2) é construída utilizando sítios de recombinação que são diferentes daqueles usados na primeira construção de direcionamento (vetor de direcionamento 1), permitindo, assim, a eliminação seletiva da cassette de seleção após a obtenção de um direcionamento bem-sucedido. O locus resultante duplamente visado está funcionalmente silenciado, na medida em que não pode ser produzida nenhuma cadeia leve λ endógena. Este locus modificado pode ser usado para a inserção de segmentos génicos V λ e J λ humanos de modo a criar um locus λ endógeno de ratinho compreendendo segmentos génicos V λ e J λ humanos, por meio do qual, após recombinação ao nível do locus modificado, o animal produz cadeias leves λ compreendendo segmentos génicos V λ e J λ humanos rearranjados ligados a um segmento génico C λ endógeno de ratinho.

A modificação genética de um ratinho para tornar os segmentos génicos λ endógenos não funcionais, em vários aspetos, resulta num ratinho que apresenta exclusivamente cadeias leves κ no seu repertório de anticorpos, tornando-o útil para avaliar o papel das cadeias leves λ na resposta imune e útil para produzir um repertório de anticorpos que compreendem domínios V κ mas não domínios V λ .

Um ratinho geneticamente modificado, que expressa um hV λ ligado a um gene C λ de ratinho após recombinação ao nível do

locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho, pode ser preparado por meio de qualquer método conhecido na técnica. Uma ilustração esquemática (sem estar à escala) da substituição dos segmentos génicos $V\lambda 2-V\lambda 3-J\lambda 2$ endógenos de ratinho por segmentos génicos $V\lambda$ e $J\lambda$ humanos é fornecida na FIG. 4A. Tal como ilustrado, um locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho que havia sido tornado não funcional é substituído por uma construção de direcionamento (vetor de direcionamento 12/1- λ) que inclui uma cassette de neomicina flanqueada por sítios de recombinação. Os segmentos génicos $V\lambda 2-V\lambda 3-J\lambda 2$ são substituídos por um fragmento genómico contendo uma sequência λ humana que inclui 12 segmentos génicos $hV\lambda$ e um único segmento génico $hJ\lambda$.

Assim, esta primeira abordagem posiciona um ou mais segmentos génicos $hV\lambda$ ao nível de um locus λ endógeno de cadeia leve, contíguos a um único segmento génico $hJ\lambda$ (FIG. 4A).

É possível efetuar modificações adicionais no locus λ endógeno de cadeia leve modificado, utilizando técnicas similares para introduzir mais segmentos génicos $hV\lambda$. Por exemplo, as ilustrações esquemáticas de duas construções de direcionamento adicionais (vetores de direcionamento +16- λ e +12- λ) usadas para a inserção progressiva de segmentos génicos $hV\lambda$ humanos adicionais são fornecidas na FIG. 5A. Tal como ilustrado, os fragmentos genómicos adicionais contendo segmentos génicos $hV\lambda$ humanos específicos são inseridos no locus λ endógeno de cadeia leve modificado em passos sucessivos, recorrendo à homologia fornecida pela inserção prévia de sequências de cadeia leve λ humanas. No seguimento de recombinação com cada uma das construções de direcionamento ilustradas, de forma sequencial, 28 segmentos génicos $hV\lambda$ adicionais são inseridos no locus λ endógeno de cadeia leve modificado. Isto cria um locus quimérico que produz uma proteína de cadeia leve λ que compreende segmentos génicos $V\lambda J\lambda$ humanos ligados a um gene $C\lambda$ de ratinho.

As abordagens descritas acima para inserir segmentos génicos de cadeia leve λ humana no locus λ de ratinho mantêm os amplificadores posicionados a jusante dos segmentos génicos $C\lambda 2-J\lambda 4-C\lambda 4$ (denominados Amp 2.4, Amp e Amp 3.1; FIG. 4A e

FIG. 5A). Esta abordagem resulta num único alelo modificado ao nível do locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho (FIG. 7A).

Descrevem-se também composições e métodos para produzir um ratinho que expressa uma cadeia leve compreendendo segmentos génicos $hV\lambda$ e $J\lambda$ ligados funcionalmente a um segmento génico $C\lambda$ de ratinho, incluindo composições e métodos para produzir um ratinho que expressa esses genes a partir de um locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho. Os métodos incluem tornar seletivamente um cluster de genes $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ endógenos de ratinho não funcional (por exemplo, por eliminação direcionada) e utilizar segmentos génicos $hV\lambda$ e $J\lambda$ ao nível do locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho para expressar um domínio $hV\lambda$ num ratinho.

Em alternativa, numa segunda abordagem, os segmentos génicos de cadeia leve λ humana poderão ser posicionados no locus κ endógeno de cadeia leve. A modificação genética, em vários aspetos, compreende uma eliminação do locus κ endógeno de cadeia leve. Por exemplo, para eliminar as cadeias leves κ de ratinho do repertório de anticorpos endógenos, é possível efetuar uma eliminação dos segmentos génicos $V\kappa$ e $J\kappa$ de ratinho. Descrevem-se igualmente embriões de ratinho e células geneticamente modificados, assim como construções de direcionamento para produzir os ratinhos, os embriões de ratinho e as células.

Pelas razões apresentadas acima, a eliminação dos segmentos génicos $V\kappa$ e $J\kappa$ de ratinho faz uso de uma perturbação relativamente pequena. Uma ilustração esquemática (sem estar à escala) dos segmentos génicos $V\kappa$ e $J\kappa$ de ratinho eliminados é fornecida na FIG. 3. Os segmentos génicos $V\kappa$ e $J\kappa$ endógenos de ratinho são eliminados mediante a deleção, mediada por recombinase, da posição das sequências de ratinho entre dois vetores de direcionamento precisamente posicionados, em que cada um deles utiliza sítios de recombinação sítio-específicos. Um primeiro vetor de direcionamento (vetor de direcionamento $J\kappa$) é utilizado num primeiro evento de direcionamento para eliminar os segmentos génicos $J\kappa$ de ratinho. Um segundo vetor de direcionamento (vetor de direcionamento $V\kappa$) é usado num segundo evento de direcionamento sequencial, para eliminar uma sequência localizada em 5' do

segmento génico V_k de ratinho mais distal. Ambos os vetores de direcionamento contêm sítios de recombinação sítio-específicos, permitindo, assim, a eliminação seletiva de ambas as cassetes de seleção e de todas as sequências de cadeia leve κ de ratinho intermédias após a obtenção de um direcionamento bem-sucedido. O locus eliminado resultante está funcionalmente silenciado, na medida em que não pode ser produzida nenhuma cadeia leve κ endógena. Este locus modificado pode ser usado para a inserção de segmentos génicos $hV\lambda$ e $J\lambda$ de modo a criar um locus κ endógeno de ratinho compreendendo segmentos génicos $hV\lambda$ e $J\lambda$, por meio do qual, após recombinação ao nível do locus modificado, o animal produz cadeias leves λ compreendendo segmentos génicos $hV\lambda$ e $J\lambda$ rearranjados ligados a um segmento génico C_k endógeno de ratinho. É possível usar vários vetores de direcionamento compreendendo sequências de cadeia leve λ humana, em conjunção com este locus κ de ratinho eliminado, para criar um locus de cadeia leve híbrido contendo segmentos génicos λ humanos ligados funcionalmente a uma região C_k de ratinho.

Assim, uma segunda abordagem posiciona um ou mais segmentos génicos $V\lambda$ humanos ao nível do locus κ de cadeia leve de ratinho, contíguos a um único segmento génico $J\lambda$ humano (vetor de direcionamento 12/1- κ ; FIG. 4B).

É possível fazer modificações nesta abordagem para adicionar segmentos génicos e/ou sequências reguladoras, de forma a otimizar a utilização das sequências de cadeia leve λ humanas a partir do locus κ de ratinho no âmbito do repertório de anticorpos do ratinho.

Numa terceira abordagem, um ou mais segmentos génicos $hV\lambda$ são posicionados ao nível do locus κ de cadeia leve de ratinho, contíguos a quatro sequências génicas $hJ\lambda$ (vetor de direcionamento 12/4- κ ; FIG. 4B).

Numa terceira abordagem, um ou mais segmentos génicos $hV\lambda$ são posicionados ao nível do locus κ de cadeia leve de ratinho, contíguos a uma sequência intergénica κ humana e uma única sequência génica $hJ\lambda$ (vetor de direcionamento 12(κ)1- κ ; FIG. 4B).

Numa quarta abordagem, um ou mais segmentos génicos hV λ são posicionados ao nível do locus κ de cadeia leve de ratinho, contíguos a uma sequência intergénica κ humana e quatro sequências génicas hJ λ (vetor de direcionamento 12(κ)4- κ ; FIG. 4B).

Todas as abordagens referidas acima para inserir segmentos génicos de cadeia leve λ humana no locus κ de ratinho mantêm o elemento amplificador intrónico κ a montante do gene C κ (designado por Ek_i; FIG. 4B e FIG. 5B) e o amplificador 3' κ a jusante do gene C κ (designado por Ek3'; FIG. 4B e FIG. 5B). As abordagens resultam em quatro alelos modificados separados ao nível do locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho (FIG. 7B).

Em vários aspetos, o ratinho geneticamente modificado compreende um *knockout* (inativação) do locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho. Num aspeto, o locus λ de cadeia leve é inativado por meio de uma estratégia que elimina a região que se estende de V λ 2 a J λ 2 e a região que se estende de V λ 1 a C λ 1 (FIG. 2). Qualquer estratégia que reduza ou elimine a capacidade do locus λ endógeno de cadeia leve para expressar os domínios λ endógenos é adequada para ser utilizada nesta divulgação.

Anticorpos com domínios lambda de ratinhos geneticamente modificados

Os ratinhos que compreendem sequências λ humanas no locus κ ou λ de cadeia leve de ratinho expressarão uma cadeia leve que compreende uma região hV λ fundida com uma região C_L (C κ ou C λ) de ratinho. Estes ratinhos são vantajosamente cruzados com ratinhos que (a) compreendem um locus de cadeia leve funcionalmente silenciado (por exemplo, um *knockout* do locus κ ou λ endógeno de cadeia leve de ratinho); (b) compreendem um locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho que compreende segmentos génicos hV e hJ ligados funcionalmente a um gene C λ endógeno de ratinho; (c) compreendem um locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho que compreende segmentos génicos hV κ e hJ κ ligados funcionalmente a um gene C κ endógeno de ratinho; e (d) um ratinho em que um alelo κ compreende segmentos hV κ e hJ κ ; e o outro alelo κ compreende segmentos

$hV\lambda$ e $hJ\lambda$; um alelo λ compreendendo segmentos $hV\lambda$ e $hJ\lambda$ e um alelo λ silenciado ou inativado; ou ambos os alelos λ compreendendo segmentos $hV\lambda$ e $hJ\lambda$; e dois alelos de cadeia pesada em que cada um deles compreende segmentos hV_H , hD_H e hJ_H .

Os anticorpos que compreendem os domínios $hV\lambda$ expressos no contexto de C κ são usados para produzir anticorpos totalmente humanos, através da clonagem dos ácidos nucleicos que codificam os domínios $hV\lambda$ em construções de expressão portadoras de genes que codificam a região C λ humana. As construções de expressão resultantes são transfetadas em células hospedeiras adequadas para expressar anticorpos que apresentam um domínio totalmente $hV\lambda$ fundido com $hC\lambda$.

EXEMPLOS

Os exemplos seguintes são fornecidos para descrever a forma de produzir e utilizar os métodos e composições do invento e não se destinam a limitar o âmbito daquilo que os inventores consideram como a sua invenção. Exceto indicação em contrário, a temperatura é indicada em graus centígrados e a pressão é a pressão atmosférica ou próximo dela.

Exemplo I

Eliminação dos loci de cadeia leve de imunoglobulinas de ratinho

Prepararam-se várias construções de direcionamento utilizando a tecnologia VELOCIGENE® (ver, por exemplo, patente US n.º 6,586,251 e Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, *Nature Biotech.* 21(6):652-659) para modificar bibliotecas genómicas de ratinho em cromossomas artificiais bacterianos (BAC), de modo a inativar os loci λ e κ de cadeia leve de ratinho.

Eliminação do locus λ de cadeia leve de ratinho. O ADN do clone BAC de ratinho RP23-135k15 (Invitrogen) foi modificado por recombinação homóloga para inativar o locus λ endógeno de

cadeia leve de ratinho, através da eliminação direcionada dos clusters de genes $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ (FIG. 2).

Resumidamente, todo o cluster proximal compreendendo os segmentos génicos $V\lambda 1$ - $J\lambda 3$ - $C\lambda 3$ - $J\lambda 1$ - $C\lambda 1$ foi eliminado num único evento de direcionamento, utilizando um vetor de direcionamento compreendendo uma cassette de neomicina flanqueada por sítios *loxP*, com um braço de homologia 5' contendo a sequência em 5' do segmento génico $V\lambda 1$ e um braço de homologia 3' contendo a sequência em 3' do segmento génico $C\lambda 1$ (FIG. 2, vetor de direcionamento 1).

Preparou-se uma segunda construção de direcionamento para eliminar com precisão o cluster distal de genes λ endógenos de ratinho contendo $V\lambda 2$ - $J\lambda 2$ - $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$, exceto que a construção de direcionamento continha um braço de homologia 5' que continha a sequência em 5' do segmento génico $V\lambda 2$ e um braço de homologia 3' que continha a sequência em 5' do segmento génico $C\lambda 2$ endógeno (FIG. 2, vetor de direcionamento 2). Assim, a segunda construção de direcionamento eliminou com precisão $V\lambda 2$ - $J\lambda 2$, deixando $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ intacto no locus λ endógeno de ratinho. As células CTE contendo um locus λ endógeno inativado (tal como descrito acima) foram confirmadas por métodos de cariotipagem e rastreio (por exemplo, TAQMAN®) conhecidos na técnica. O ADN foi depois isolado das células CTE modificadas e submetido a tratamento com a recombinase CRE, mediando assim a eliminação da cassette de direcionamento proximal contendo o gene de seleção de neomicina e deixando apenas um único sítio *loxP* no ponto de eliminação (FIG. 2, em baixo).

Eliminação do locus κ de cadeia leve de ratinho.

Prepararam-se várias construções de direcionamento utilizando métodos similares aos descritos acima para modificar o ADN dos clones BAC de ratinho RP23-302g12 e RP23-254m04 (Invitrogen) por recombinação homóloga, de modo a inativar o locus κ de cadeia leve de ratinho num processo em dois passos (FIG. 3).

Resumidamente, os segmentos génicos $J\kappa$ (1-5) do locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho foram eliminados num único evento de direcionamento, utilizando um vetor de direcionamento compreendendo uma cassette de higromicina-timidina-cinase (*hyg*-TK) com um único sítio *loxP* em 3' da

cassete hyg-TK (FIG. 3; vetor de direcionamento Jk). Os braços de homologia utilizados para produzir este vetor de direcionamento continham a sequência genómica de ratinho em 5' e em 3' dos segmentos génicos Jk endógenos de ratinho. Num segundo evento de direcionamento, preparou-se um segundo vetor de direcionamento para eliminar uma parte da sequência genómica de ratinho a montante (5') do segmento génico Vk endógeno de ratinho mais distal (FIG. 3; vetor de direcionamento Vk). Este vetor de direcionamento continha um sítio *lox511* invertido, um sítio *loxP* e uma cassete de neomicina. Os braços de homologia usados para produzir este vetor de direcionamento continham a sequência genómica de ratinho a montante do segmento génico Vk de ratinho mais distal. Os vetores de direcionamento foram utilizados de forma sequencial (isto é, Jk e depois Vk) para visar o ADN nas células CTE. As células CTE portadoras de um cromossoma duplamente visado (isto é, um único locus κ endógeno de ratinho visado por ambos os vetores de direcionamento) foram confirmadas por métodos de cariotipagem e rastreio (por exemplo, Taqman™) conhecidos na técnica. O ADN foi depois isolado das células CTE modificadas e submetido a tratamento com a recombinase Cre, mediando assim a eliminação dos segmentos génicos Vk endógenos de ratinho e de ambas as cassetes de seleção, e deixando dois sítios *lox* justapostos e orientados inversamente um em relação ao outro (FIG. 3, em baixo; SEQ ID NO:1).

Deste modo, criaram-se dois loci endógenos de cadeia leve modificados (κ e λ) com as regiões constantes e amplificadoras intactas para, de forma progressiva e precisa, inserir segmentos génicos λ da linha germinal humana não rearranjados, utilizando vetores de direcionamento como descrito abaixo.

Exemplo II

Substituição dos loci de cadeia leve de ratinho por um minilocus λ de cadeia leve humano

Prepararam-se vários vetores de direcionamento para a inserção progressiva de segmentos génicos λ humanos nos loci κ e λ endógenos de cadeia leve de ratinho, usando métodos similares aos descritos acima. Efetuaram-se múltiplas modificações iniciais independentes nos loci endógenos de

cadeia leve, em que cada uma delas produziu um locus quimérico de cadeia leve contendo segmentos génicos hV λ e J λ ligados funcionalmente a genes de região constante e a amplificadores de cadeia leve de ratinho.

Um minilocus λ humano contendo 12 V λ humanos e um segmento génico J λ humano. Construiu-se uma série de vetores de direcionamento iniciais contendo os primeiros 12 segmentos génicos V λ humanos consecutivos do cluster A e um segmento génico hJ λ 1 ou quatro segmentos génicos hJ λ , utilizando um clone BAC humano denominado RP11-729g4 (Invitrogen). As FIG. 4A e 4B ilustram os vetores de direcionamento que foram construídos para efetuar uma inserção inicial de segmentos génicos de cadeia leve λ humana nos loci λ e κ de cadeia leve de ratinho, respetivamente.

Para um primeiro conjunto de vetores de direcionamento iniciais, manipulou-se um fragmento de ADN de 124125 bp oriundo do clone BAC 729g4, contendo 12 segmentos génicos hV λ e um segmento génico hJ λ 1, para incluir um sítio PI-SceI 996 bp a jusante (3') do segmento génico hJ λ 1 para a ligação de um braço de homologia 3'. Utilizaram-se dois conjuntos diferentes de braços de homologia para a ligação a este fragmento humano: um conjunto de braços de homologia continha sequências λ endógenas de ratinho oriundas do clone BAC 135k15 (FIG.4A) e outro conjunto continha a sequência κ endógena em 5' e em 3' dos segmentos génicos V κ e J κ de ratinho, oriunda dos clones BAC de ratinho RP23-302g12 e RP23-254m04, respetivamente (FIG. 4B).

Para o vetor de direcionamento 12/1- λ (FIG. 4A), construiu-se um sítio PI-SceI na extremidade 5' de um fragmento de ADN de 27847 bp contendo a sequência C λ 2-J λ 4-C λ 4 e o amplificador 2.4 de ratinho do locus λ de ratinho modificado descrito no Exemplo 1. O fragmento de ratinho de ~28 kb foi usado como um braço de homologia 3' por ligação ao fragmento λ humano de ~ 124 kb, o que criou uma junção em 3' contendo, de 5' para 3', um segmento génico hJ λ 1, 996 bp de sequência λ humana em 3' do segmento génico hJ λ 1, 1229 bp de sequência λ de ratinho em 5' do gene C λ 2 de ratinho, o gene C λ 2 de ratinho e a restante porção do fragmento de ratinho de ~ 28 kb. A montante (5') do segmento génico V λ 3-12 humano encontravam-se

1456 bp adicionais de sequência λ humana antes do início do braço de homologia 5', que continha 23792 bp de ADN genómico de ratinho correspondente à sequência em 5' do locus λ endógeno de ratinho. Entre o braço de homologia 5' e o início da sequência λ humana, encontrava-se uma cassette de neomicina flanqueada por sítios Frt.

Deste modo, o vetor de direcionamento 12/1- λ incluía, de 5' para 3', um braço de homologia 5' contendo ~24 kb de sequência genómica λ de ratinho em 5' do locus λ endógeno, um sítio Frt 5', uma cassette de neomicina, um sítio Frt 3', ~123 kb de sequência λ genómica humana contendo os primeiros 12 segmentos génicos hV λ consecutivos e um segmento génico hJ λ 1, um sítio PI-SceI e um braço de homologia 3' contendo ~28 kb de sequência genómica de ratinho incluindo os segmentos génicos C λ 2-J λ 4-C λ 4 endógenos, a sequência do amplificador 2.4 de ratinho e sequência genómica de ratinho adicional a jusante (3') do amplificador 2.4 (FIG. 4A).

De forma idêntica, o vetor de direcionamento 12/1- κ (FIG. 4B) utilizou o mesmo fragmento λ humano de ~124 kb, embora tenha usado braços de homologia contendo sequência κ de ratinho para que o direcionamento para o locus κ endógeno pudesse ser obtido por recombinação homóloga. Assim, o vetor de direcionamento 12/1- κ incluía, de 5' para 3', um braço de homologia 5' contendo ~23 kb de sequência genómica de ratinho em 5' do locus κ endógeno, um sítio I-CeuI, um sítio Frt 5', uma cassette de neomicina, um sítio Frt 3', ~124 kb de sequência λ genómica humana contendo os primeiros 12 segmentos génicos hV λ consecutivos e um segmento génico hJ λ 1, um sítio PI-SceI e um braço de homologia 3' contendo ~28 kb de sequência genómica de ratinho incluindo o gene C κ , E κ i e E κ 3' endógenos de ratinho e sequência genómica de ratinho adicional a jusante (3') de E κ 3' (FIG. 4B; vetor de direcionamento 12/1- κ).

A recombinação homóloga com qualquer um destes dois vetores de direcionamento iniciais criou um locus (κ ou λ) de cadeia leve de ratinho modificado, contendo 12 segmentos génicos hV λ e um segmento génico hJ λ 1 ligados funcionalmente ao gene de região constante e aos amplificadores endógenos de cadeia leve de ratinho (C κ ou C λ 2 e E κ i/E κ 3' ou Amp 2.4/Amp

3.1), que, mediante recombinação, conduz à formação de uma cadeia leve λ quimérica.

Um minilocus λ humano contendo 12 V λ humanos e quatro segmentos génicos J λ humanos. Noutra abordagem para acrescentar diversidade a um locus λ quimérico de cadeia leve, construiu-se um terceiro vetor de direcionamento inicial para inserir os primeiros 12 segmentos génicos V λ humanos consecutivos do cluster A e os segmentos génicos hJ λ 1, 2, 3 e 7 no locus κ de cadeia leve de ratinho (FIG. 4B; vetor de direcionamento 12/4- κ). Um segmento de ADN contendo os segmentos génicos hJ λ 1, J λ 2, J λ 3 e J λ 7 foi preparado por síntese de ADN *de novo* (Integrated DNA Technologies), incluindo cada segmento génico J λ e a sequência genómica humana de ~100 bp de ambas as regiões imediatamente 5' e 3' de cada segmento génico J λ . Introduziu-se um sítio PI-SceI na extremidade 3' deste fragmento de ADN de ~1 kb e ligou-se a uma cassette de cloranfenicol. Os braços de homologia foram amplificados por PCR a partir de sequência λ humana, ao nível das posições 5' e 3' em relação ao segmento génico hJ λ 1 do clone BAC humano 729g4. A recombinação homóloga com este vetor de direcionamento intermédio foi efetuada num clone BAC 729g4 modificado, que havia sido previamente visado a montante (5') do segmento génico V λ 3-12 humano com uma cassette de neomicina flanqueada por sítios Ftr, que também continha um sítio I-CeuI em 5' do sítio Frt 5'. O clone BAC 729g4 duplamente visado incluía, de 5' para 3', um sítio I-CeuI, um sítio Frt 5', uma cassette de neomicina, um sítio Frt 3', um fragmento de ~123 kb contendo os primeiros 12 segmentos génicos hV λ , um fragmento de ~1 kb contendo os segmentos génicos J λ 1, 2, 3 e 7 humanos, um sítio PI-SceI e uma cassette de cloranfenicol. Este vetor de direcionamento intermédio foi digerido com I-CeuI e PI-SceI e subsequentemente ligado ao clone BAC de ratinho modificado (descrito acima) para criar o terceiro vetor de direcionamento.

Esta ligação resultou num terceiro vetor de direcionamento para a inserção de sequências λ humanas no locus κ endógeno de cadeia leve, que incluía, de 5' para 3', um braço de homologia 5' contendo ~23 kb de sequência genómica em 5' do locus κ endógeno de ratinho, um sítio I-CeuI, um sítio Frt 5', uma cassette de neomicina, um sítio Frt 3', um fragmento de ~123 kb contendo os primeiros 12 segmentos génicos hV λ , um

fragmento de ~1 kb contendo os segmentos génicos hJ λ 1, 2, 3 e 7, um sítio PI-SceI e um braço de homologia 3' contendo ~28 kb de sequência genómica de ratinho incluindo o gene C κ , E κ 1 e E κ 3' endógenos de ratinho e sequência genómica de ratinho adicional a jusante (3') de E κ 3' (FIG. 4B; vetor de direcionamento 12/4- κ). A recombinação homóloga com este terceiro vetor de direcionamento criou um locus κ de cadeia leve de ratinho modificado, contendo 12 segmentos génicos hV λ e quatro segmentos génicos hJ λ ligados funcionalmente ao gene C κ endógeno de ratinho, que, mediante recombinação, conduz à formação de uma cadeia leve κ de ratinho/ λ humana quimérica.

Um minilocus λ humano com uma sequência de cadeia leve κ humana integrada. De modo idêntico, construíram-se dois vetores de direcionamento adicionais semelhantes aqueles produzidos para efetuar uma inserção inicial de segmentos génicos λ humanos no locus κ endógeno de cadeia leve (FIG. 4B; vetores de direcionamento 12/1- κ e 12/4- κ) para inserir, de forma progressiva, segmentos génicos de cadeia leve λ humana, recorrendo a vetores de direcionamento de construção singular contendo sequências genómicas λ e κ humanas contíguas. Estes vetores de direcionamento foram construídos para incluir uma sequência genómica κ humana de ~23 kb, localizada naturalmente entre os segmentos génicos V κ 4-1 e J κ 1 humanos. Esta sequência genómica κ humana foi especificamente posicionada nestes dois vetores de direcionamento adicionais entre os segmentos génicos V λ humanos e J λ humanos (FIG. 4B, vetores de direcionamento 12(κ)1- κ e 12(κ)4- κ).

Ambos os vetores de direcionamento contendo a sequência genómica κ humana foram preparados utilizando o clone BAC RP11-729g4 modificado descrito acima (FIG. 6). Este clone BAC modificado foi visado por uma cassette de seleção de espectinomicina flanqueada por sítios de restrição NotI e AsiSI (FIG.6, em cima à esquerda). A recombinação homóloga com a cassette de espectinomicina resultou num clone BAC 729g4 duplamente visado que incluía, de 5' para 3', um sítio I-CeuI, um sítio Frt 5', uma cassette de neomicina, um sítio Frt 3', um fragmento de ~123 kb contendo os primeiros 12 segmentos génicos hV λ , um sítio NotI cerca de 200 bp a jusante (3') da sequência nonamérica do segmento génico hV λ 3-1, uma cassette de espectinomicina e um sítio AsiSI. Um clone BAC humano separado

contendo a sequência κ humana (CTD-2366j12) foi visado duas vezes de forma independente para inserir sítios de restrição em localizações entre os segmentos génicos hVk4-1 e hJk1, de forma a permitir a clonagem subsequente de um fragmento de ~23 kb para ligação aos segmentos génicos hV λ contidos no clone BAC 729g4 modificado duplamente visado (FIG. 6, em cima à direita).

Resumidamente, o clone BAC 2366j12 tem cerca de 132 kb e contém os segmentos génicos hVk 1-6, 1-5, 2-4, 7-3, 5-2, 4-1, a sequência genómica κ humana a jusante dos segmentos génicos Vk, os segmentos génicos hJk 1-5, o hCk e cerca de 20 kb de sequência genómica adicional do locus κ humano. Este clone foi inicialmente visado por um vetor de direcionamento contendo uma cassete de higromicina flanqueada por sítios Frt e um sítio NotI a jusante (3') do sítio Frt 3'. Os braços de homologia para este vetor de direcionamento continham a sequência genómica humana em 5' e em 3' dos segmentos génicos Vk presentes no clone BAC, de modo que, após recombinação homóloga com este vetor de direcionamento, os segmentos génicos Vk foram eliminados e foi introduzido um sítio NotI ~133 bp a jusante do segmento génico hVk4-1 (FIG. 6, em cima à direita). Este clone BAC 2366j12 modificado foi visado na extremidade 3' por dois vetores de direcionamento independentes para eliminar os segmentos génicos hJk, utilizando uma cassete de cloranfenicol que também continha um segmento génico hJ λ 1, um sítio PI-SceI e um sítio AsiSI ou então um fragmento genómico λ humano contendo quatro segmentos génicos hJ λ (acima), um sítio PI-SceI e um sítio AsiSI (FIG. 6, em cima à direita). Os braços de homologia para estes dois vetores de direcionamento similares continham a sequência em 5' e em 3' dos segmentos génicos hJk. A recombinação homóloga com estes segundos vetores de direcionamento e o clone BAC 2366j12 modificado deu origem a um clone 2366j12 duplamente visado que incluía, de 5' para 3', um sítio Frt 5', uma cassete de higromicina, um sítio Frt 3', um sítio NotI, um fragmento genómico de 22800 bp do locus κ humano contendo a região intergénica entre os segmentos génicos Vk4-1 e Jk1, um segmento génico hJ λ 1 ou um fragmento genómico λ humano contendo hJ λ 1, J λ 2, J λ 3 e J λ 7, um sítio PI-SceI e uma cassete de cloranfenicol (FIG. 6, em cima à direita). Os dois vetores de direcionamento finais para efetuar as duas modificações adicionais foram obtidos por meio de dois

passos de ligação, usando os clones 729g4 e 2366j12 duplamente visados.

Os clones 729g4 e 2366j12 duplamente visados foram digeridos com NotI e AsiSI, originando um fragmento contendo a cassette de neomicina e os segmentos génicos hV λ e outro fragmento contendo o fragmento genómico de ~23 kb do locus κ humano contendo a região intergénica entre os segmentos génicos Vk4-1 e Jk1, um segmento génico hJ λ 1 ou então um fragmento genómico contendo os segmentos génicos hJ λ 1, J λ 2, J λ 3 e J λ 7, o sítio PI-SceI e a cassette de cloranfenicol, respetivamente. A ligação destes fragmentos produziu dois clones BAC únicos contendo, de 5' para 3', os segmentos génicos hV λ , a sequência genómica κ humana entre os segmentos génicos Vk4-1 e Jk1, um segmento génico hJ λ 1 ou então um fragmento genómico contendo os segmentos génicos hJ λ 1, J λ 2, J λ 3 e J λ 7, um sítio PI-SceI e uma cassette de cloranfenicol (FIG. 6, em baixo). Estes novos clones BAC foram depois digeridos com I-CeuI e PI-SceI para libertar os fragmentos únicos contendo a cassette de neomicina a montante e as sequências λ e κ humanas contíguas e ligados num clone BAC de ratinho modificado 302g12 que continha, de 5' para 3', a sequência genómica de ratinho em 5' do locus κ endógeno, um sítio I-CeuI, um sítio Frt 5', uma cassette de neomicina, um sítio Frt 3', os segmentos génicos hV λ (3-12 a 3-1), um sítio NotI ~200 bp a jusante de V λ 3-1, ~23 kb da sequência κ humana encontrada naturalmente entre os segmentos génicos Vk4-1 e Jk1, um segmento génico hJ λ 1 ou então um fragmento genómico contendo os segmentos génicos hJ λ 1, J λ 2, J λ 3 e J λ 7, o Eki de ratinho, o gene Ck de ratinho e o Ek3' (FIG. 4; vetores de direcionamento 12hV λ -VkJk-hJ λ 1 e 12hV λ -VkJk-4hJ λ). A recombinação homóloga com estes dois vetores de direcionamento criou dois loci κ de cadeia leve de ratinho modificados separados, contendo 12 segmentos génicos hV λ , a sequência genómica κ humana e um ou quatro segmentos génicos hJ λ ligados funcionalmente ao gene Ck endógeno de ratinho, que, mediante recombinação, conduzem à formação de uma cadeia leve κ de ratinho/ λ humana quimérica.

Exemplo III

Introdução de segmentos génicos V λ humanos adicionais num minilocus λ de cadeia leve humano

Adicionaram-se segmentos génicos hV λ adicionais de forma independente a cada uma das modificações iniciais descritas no Exemplo 2, utilizando vetores de direcionamento e métodos similares (FIG. 5A, vetor de direcionamento +16- λ e FIG. 5B, vetor de direcionamento +16- κ).

Introdução de 16 segmentos génicos V λ humanos adicionais.

Os braços de homologia a montante (5') utilizados na construção dos vetores de direcionamento para adicionar 16 segmentos génicos hV λ adicionais aos loci de cadeia leve modificados descritos no Exemplo 2 continham sequência genómica de ratinho em 5' dos loci κ ou λ endógenos de cadeia leve. Os braços de homologia 3' foram os mesmos para todos os vetores de direcionamento e continham sequência genómica humana sobreponível à extremidade 5' da sequência λ humana das modificações descritas no Exemplo 2.

Resumidamente, construíram-se dois vetores de direcionamento para a introdução de 16 segmentos génicos hV λ adicionais nos loci de cadeia leve de ratinho modificados descritos no Exemplo 2 (FIG. 5A e 5B; vetor de direcionamento +16- λ ou +16- κ). Um fragmento de ADN de ~172 kb oriundo do clone BAC humano RP11-761I13 (Invitrogen), contendo 21 segmentos génicos hV λ consecutivos do cluster A, foi modificado com um braço de homologia 5' contendo sequência genómica de ratinho em 5' dos loci κ ou λ endógenos de cadeia leve e um braço de homologia 3' contendo sequência λ genómica humana. Os braços de homologia (κ ou λ) 5' utilizados nestas construções de direcionamento foram os mesmos braços de homologia 5' descritos no Exemplo 2 (FIG. 5A e 5B). O braço de homologia 3' incluía uma sobreposição de 53057 bp de sequência λ genómica humana correspondente à extremidade 5' equivalente do fragmento de ~123 kb de sequência λ genómica humana descrito no Exemplo 2. Estes dois vetores de direcionamento incluíam, de 5' para 3', um braço de homologia 5' contendo ~23 kb de sequência genómica de ratinho em 5' do locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho ou ~24 kb de sequência genómica de ratinho em 5' do locus λ endógeno de cadeia leve, um sítio Frt 5', uma cassette de higromicina, um sítio Frt 3' e 171457 bp de sequência λ genómica humana contendo 21 segmentos génicos hV λ consecutivos, ~53 kb dos quais se sobrepõem à extremidade 5'

da sequência λ humana descrita no Exemplo 3 e atuam como o braço de homologia 3' para esta construção de direcionamento (FIG. 5A e 5B, vetores de direcionamento +16- λ ou +16- κ). A recombinação homóloga com estes vetores de direcionamento criou loci κ e λ de cadeia leve de ratinho modificados independentemente, contendo 28 segmentos génicos hV λ e um segmento génico hJ λ 1 ligados funcionalmente a genes de região constante endógenos de ratinho (C κ ou C λ 2), que, mediante recombinação, conduzem à formação de uma cadeia leve quimérica.

De uma forma idêntica, o vetor de direcionamento +16- κ também foi usado para introduzir os 16 segmentos génicos hV λ adicionais nas outras modificações iniciais descritas no Exemplo 2 que incorporavam múltiplos segmentos génicos hJ λ , com e sem uma sequência κ humana integrada (FIG. 4B). A recombinação homóloga com este vetor de direcionamento ao nível do locus κ endógeno de ratinho contendo as outras modificações iniciais criou loci κ de cadeia leve de ratinho, contendo 28 segmentos génicos hV λ e os segmentos génicos hJ λ 1, 2, 3 e 7, com e sem uma sequência genómica V κ -J κ humana, ligados funcionalmente ao gene C κ endógeno de ratinho, que, mediante recombinação, conduzem à formação de uma cadeia leve λ - κ quimérica.

Introdução de 12 segmentos génicos V λ humanos adicionais.

Adicionaram-se segmentos génicos hV λ adicionais de forma independente a cada uma das modificações descritas acima, utilizando vetores de direcionamento e métodos similares. A estrutura final do locus, que resulta de recombinação homóloga com os vetores de direcionamento contendo os segmentos génicos hV λ adicionais, está ilustrada nas FIGS. 7A e 7B.

Resumidamente, construiu-se um vetor de direcionamento para a introdução de 12 segmentos génicos hV λ adicionais nos loci λ e κ de cadeia leve de ratinho modificados descritos acima (FIG. 5A e 5B; vetores de direcionamento +12- λ ou 12- κ). Um fragmento de ADN de 93674 pb oriundo do clone BAC humano RP11-761I13 (Invitrogen), contendo 12 segmentos génicos hV λ consecutivos do cluster B, foi modificado com um braço de homologia 5' contendo sequência genómica de ratinho em 5' dos loci κ ou λ endógenos de cadeia leve de ratinho e um braço de homologia 3' contendo sequência λ genómica humana. Os braços

de homologia 5' utilizados nesta construção de direcionamento foram os mesmos braços de homologia 5' utilizados para a adição dos 16 segmentos génicos hV λ descritos acima (FIG. 5A e 5B). O braço de homologia 3' foi preparado por inserção de um sítio PI-SceI ~3431 bp a montante (5') do segmento génico V λ 3-29P humano contido num fragmento genómico de 27468 bp de sequência λ humana, proveniente do clone BAC RP11-761I13. Este sítio PI-SceI atuou como ponto de ligação para unir o fragmento de ~94 kb de sequência λ humana adicional ao fragmento de ~27 kb de sequência λ humana que é sobreponível à extremidade 5' da sequência λ humana na modificação prévia, utilizando os vetores de direcionamento +16- λ ou +16- κ (FIG. 5A e 5B). Estes dois vetores de direcionamento incluíam, de 5' para 3', um braço de homologia 5' contendo ~23 kb de sequência genómica de ratinho em 5' do locus κ endógeno de cadeia leve ou ~24 kb de sequência genómica de ratinho em 5' do locus λ endógeno de cadeia leve, um sítio Frt 5', uma cassete de neomicina, um sítio Frt 3' e 121188 bp de sequência λ genómica humana contendo 16 segmentos génicos hV λ e um sítio PI-SceI, ~27 kb dos quais se sobrepõem à extremidade 5' da sequência λ humana proveniente da inserção dos 16 segmentos génicos hV λ adicionais e atuam como o braço de homologia 3' para esta construção de direcionamento (FIG. 5A e 5B, vetores de direcionamento +12- λ ou 12- κ). A recombinação homóloga com estes vetores de direcionamento criou loci κ e λ de cadeia leve de ratinho modificados independentemente, contendo 40 segmentos génicos hV λ e um segmento J λ 1 humano ligados funcionalmente a genes de região constante endógenos de ratinho (C κ ou C λ 2), que, mediante recombinação, conduzem à formação de uma cadeia leve quimérica (final da FIG.5A e 5B).

De uma forma idêntica, o vetor de direcionamento +12- κ também foi usado para introduzir os 12 segmentos génicos hV λ adicionais nas outras modificações iniciais que incorporavam múltiplos segmentos génicos hJ λ , com e sem uma sequência κ humana integrada (FIG. 4B). A recombinação homóloga com este vetor de direcionamento ao nível do locus κ endógeno de ratinho contendo as outras modificações criou um locus κ de cadeia leve de ratinho, contendo 40 segmentos génicos hV λ e os segmentos génicos hJ λ 1, 2, 3 e 7, com e sem uma sequência genómica V κ -J κ humana, ligados funcionalmente ao gene C κ

endógeno de ratinho, que, mediante recombinação, conduz à formação de uma cadeia leve λ - κ quimérica.

Exemplo IV

Identificação de células CTE visadas que transportam segmentos génicos de cadeia leve λ humana

O ADN de BAC visado preparado de acordo com os Exemplos precedentes foi usado para efetuar a eletroporação de células CTE de ratinho, de modo a criar células CTE modificadas destinadas a gerar ratinhos quiméricos que expressam segmentos génicos de cadeia leve λ humana. As células CTE contendo uma inserção de segmentos génicos de cadeia leve λ humana não rearranjados foram identificadas por meio de um ensaio TAQMAN® quantitativo. Desenharam-se conjuntos de iniciadores e sondas específicos para a inserção de sequências λ humanas e as cassetes de seleção associadas (ganho de alelo, GDA), a perda de sequências endógenas de ratinho e quaisquer cassetes de seleção (perda de alelo, PDA) e a retenção de sequências flanqueantes de ratinho (retenção de alelo, RA). Para cada inserção adicional de sequências λ humanas, utilizaram-se conjuntos de iniciadores e sondas adicionais para confirmar a presença das sequências λ humanas adicionais, assim como os conjuntos de iniciadores e sondas anteriores para confirmar a retenção das sequências humanas previamente visadas. A Tabela 1 apresenta os iniciadores e sondas associadas utilizados nos ensaios de PCR quantitativos. A Tabela 2 apresenta as combinações usadas para confirmar a inserção de cada secção de segmentos génicos de cadeia leve λ humana nos clones de células CTE.

As células CTE portadoras dos segmentos génicos de cadeia leve λ humana são opcionalmente transfetadas com uma construção que expressa FLP, de forma a remover a cassette de neomicina flanqueada por sítios Frt introduzida pela inserção da construção de direcionamento contendo os segmentos génicos V λ 5-52-V λ 1-40 humanos (FIG. 5A e 5B). A cassette de neomicina poderá ser opcionalmente removida através do cruzamento com ratinhos que expressam a recombinase FLP (por exemplo, US 6,774,279). Opcionalmente, a cassette de neomicina é conservada nos ratinhos.

Tabela 1

Iniciador	SEQ ID NO:	Sonda	SEQ ID NO:
hL2F	2	hL2P	24
hL2R	3		
hL3F	4	hL3P	25
hL3R	5		
NeoF	6	NeoP	26
NeoR	7		
61hJ1F	8	61hJ1P	27
61hJ1R	9		
67hT1F	10	67hT1P	28
67hT1R	11		
67hT3F	12	67hT3P	29
67hT3R	13		
HygF	14	HygP	30
HygR	15		
MKD2F	16	MKD2P	31
MKD2R	17		
MKP8F	18	MKP8P	32
MKP8R	19		
MKP15F	20	MKP15P	33
MKP15R	21		
MK20F	22	-	-
MKP4R	23		
68h2F	34	68h2P	38
68h2R	35		
68h5F	36	68h5P	39
68h5R	37		
mL1F	75	mL1P	83
mL1R	76		
mL2F	77	mL2P	84

mL2R	78		
mL11F	79	mL11P	85
mL11R	80		
mL12F	81	mL12P	86
mL12R	82		

Tabela 2

Modificação	Ensaio	Conjunto de iniciadores direto/inverso	Sonda	Localização da sequência
Inserção de 12 hVλ e hJλ1	GDA	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12-hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		61hJ1F/61hJ1R	61hJ1P	Sequência hJλ
		NeoF/NeoR	NeoP	Cassete de neomicina
	PDA	MK20F/MKP4R	-	Sequência lox511/loxP do locus κ inativado
		HygF/HygR	HygP	Cassete de higromicina do locus λ inativado
		mL1F/mL1R	mL1P	Cluster Vλ1-Cλ1 de ratinho
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11 F/mL11 R	mL11P	Cluster Vλ2-Cλ2 de ratinho
		mL12F/mL12R	mL12P	
	RA/PDA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Sequência de ratinho em 5' do locus Vκ
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Sequência de ratinho em 3' do locus Vκ
	GDA	67hT1F/67hT1R	67hT1P	hVλ3-27-hVκλ3-12
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	
		HygF/HygR	HygP	Cassete de higromicina

Inserção de 16 hVλ	PDA	NeoF/NeoR	NeoP	Cassete de neomicina
		mL1F/mL1R	mL1P	Cluster Vλ1-Cλ1 de ratinho
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Cluster Vλ2-Cλ2 de ratinho
		mL12F/mL12R	mL12P	
	RA	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12-hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
	RA/PDA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Sequência de ratinho em 5' do locus Vκ
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Sequência de ratinho em 3' do locus Vκ
Inserção de 12 hVλ	GDA	68h2F/68h2R	68h2P	hV7λ5-52-hVλ1-40
		68h5F/68h5R	68h5P	
		NeoF/NeoR	NeoP	Cassete de neomicina
	PDA	HygF/HygR	HygP	Cassete de higromicina
		mL1F/mL1R	mL1P	Cluster Vλ1-Cλ1 de ratinho
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Cluster Vλ2-Cλ2 de ratinho
		mL12F/mL12R	mL12P	
	RA	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12-hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		67hT1 F/67hT1 R	67hT1P	hVλ3-27-hVλ3-12
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	
	RA/PDA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Sequência de ratinho em 5' do locus Vκ
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Sequência de ratinho em 3' do locus Vκ

Exemplo V

Geração de ratinhos que expressam cadeias leves λ humanas a partir de um locus endógeno de cadeia leve

As células CTE visadas descritas acima foram usadas como células CTE dadoras e introduzidas num embrião de ratinho de 8 células pelo método VELOCIMOUSE® (ver, por exemplo, Patente U.S. n.º 7,294,754 e 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). Os VELOCIMICE® (ratinhos F0 totalmente derivados da célula CTE dadora) portadores de segmentos génicos λ humanos foram identificados por genotipagem, utilizando uma modificação do ensaio de alelos (Valenzuela et al., *supra*) que detetou a presença dos segmentos génicos λ humanos invulgares (*supra*).

Utilização de cadeias leves κ : λ de ratinhos portadores de segmentos génicos de cadeia leve λ humana. Ratinhos homozigóticos para cada uma das três inserções sucessivas de segmentos génicos hV λ com um único segmento génico hJ λ (FIG. 5B) e ratinhos homozigóticos para uma primeira inserção de segmentos génicos hV λ com um único segmento génico hJ λ ou então com quatro segmentos génicos J λ humanos, incluindo uma sequência genómica Vk-Jk humana (FIG. 4B), foram analisados quanto à expressão das cadeias leves κ e λ em esplenócitos, utilizando citometria de fluxo.

Resumidamente, os baços foram colhidos de grupos de ratinhos (variando entre três e sete animais por grupo) e triturados usando lâminas de vidro. Após a lise dos glóbulos vermelhos (GV) com tampão de lise ACK (Lonza Walkersville), os esplenócitos foram corados com anticorpos específicos para CD19 de ratinho (Clone 1D3; BD Biosciences), CD3 de ratinho (17A2; Biolegend), Ig κ de ratinho (187.1; BD Biosciences) e Ig λ de ratinho (RML-42; Biolegend) conjugados com corantes fluorescentes. Os dados foram adquiridos utilizando um citómetro de fluxo BD™ LSR II (BD Biosciences) e analisados com recurso ao software FLOWJO™ (Tree Star, Inc.). A Tabela 3 apresenta os valores percentuais médios para a expressão de células B (CD19⁺), cadeia leve κ (CD19⁺Ig κ ⁺Ig λ ⁻) e cadeia leve

λ (CD19⁺Igk-Ig⁺) observada nos esplenócitos provenientes dos grupos de animais portadores de cada modificação genética.

Numa experiência similar, o conteúdo das células B do compartimento esplênico de ratinhos homozigóticos para uma primeira inserção de 12 hV λ e quatro segmentos génicos hJ λ , incluindo uma sequência genómica Vk-Jk humana, ligados funcionalmente ao gene Ck de ratinho (final da FIG. 4B) e de ratinhos homozigóticos para 40 hV λ e um segmento génico hJ λ (final da FIG. 5B ou topo da FIG. 7B) foi analisado quanto à expressão de Igk e Igk λ , utilizando citometria de fluxo (como descrito acima). A FIG. 8A ilustra a expressão de Ig λ e Igk em células B CD19⁺ para um ratinho representativo de cada grupo. O número de células B CD19⁺ por baço também foi registado para cada ratinho (FIG. 8B).

Noutra experiência, o conteúdo das células B dos compartimentos esplênico e da medula óssea de ratinhos homozigóticos para 40 hV λ e quatro segmentos génicos hJ λ , incluindo uma sequência genómica Vk-Jk humana, ligados funcionalmente ao gene Ck de ratinho (final da FIG. 7B) foi analisado em termos de progressão através do desenvolvimento das células B, utilizando citometria de fluxo de vários marcadores de superfície celular.

Resumidamente, dois grupos (N=3 ambos, 9-12 semanas de idade, machos e fêmeas) de ratinhos de tipo selvagem e de ratinhos homozigóticos para 40 hV λ e quatro segmentos génicos hJ λ , incluindo uma sequência genómica Vk-Jk humana, ligados funcionalmente ao gene Ck de ratinho foram sacrificados, e os baços e a medula óssea foram colhidos. A medula óssea foi colhida dos fémures por irrigação com meio RPMI completo (meio RPMI suplementado com soro fetal de vitelo, piruvato de sódio, Hepes, 2-mercaptoetanol, aminoácidos não essenciais e gentamicina). Os GV das preparações de baço e de medula óssea foram lisados com tampão de lise ACK (Lonza Walkersville), seguidos de lavagem com meio RPMI completo. Incubaram-se 1×10^6 células com anticorpo anti-CD16/CD32 de ratinho (2.4G2, BD Biosciences) em gelo durante 10 minutos, seguida de marcação com um painel de anticorpos selecionados durante 30 minutos em gelo.

Painel da medula óssea: anti-CD43-FITC de ratinho (1B11, BioLegend), PE-ckit (2B8, BioLegend), PeCy7-IgM (II/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-IgD (11-26c.2a, BioLegend), APC-B220 (RA3-6B2, eBioscience), APC-H7-CD19 (ID3, BD) e Pacific Blue-CD3 (17A2, BioLegend).

Painel da medula óssea e baço: anti-Igk-FITC de ratinho (187.1, BD), PE-Igλ (RML-42, BioLegend), PeCy7-IgM (II/41, ebioscience), PerCP-Cy5.5-IgD (11-26c.2a, BioLegend), Pacific Blue-CD3 (17A2, BioLegend), APC-B220 (RA3-6B2, eBioscience), APC-H7-CD19 (ID3, BD).

Após a coloração, as células foram lavadas e fixadas em formaldeído a 2%. A aquisição dos dados foi efetuada num citómetro de fluxo FACSCANTOII™ (BD Biosciences) e analisada com recurso ao software FLOWJO™ (Tree Star, Inc.). As FIGS. 9A - 9D mostram os resultados para o compartimento esplénico de um ratinho representativo de cada grupo. As FIGS. 10A - 10E mostram os resultados para o compartimento da medula óssea de um ratinho representativo de cada grupo. A Tabela 4 apresenta os valores percentuais médios para a expressão de células B (CD19⁺), cadeia leve κ (CD19⁺Igκ⁺Igλ⁻) e cadeia leve λ (CD19⁺Igκ⁻Ig⁺) observada nos esplenócitos provenientes dos grupos de animais portadores de várias modificações genéticas. A Tabela 5 apresenta os valores percentuais médios para as células B (CD19⁺), as células B maduras (B220^{hi}IgM⁺), as células B imaturas (B220^{int}IgM⁺), as células B imaturas que expressam a cadeia leve κ (B220^{int}IgM⁺Igκ⁺) e as células B imaturas que expressam a cadeia leve λ (B220^{int}IgM⁺Igλ⁺) observados na medula óssea de ratinhos de tipo selvagem e de ratinhos homozigóticos para 40 hVλ e quatro segmentos génicos hJλ, incluindo uma sequência genómica Vk-Jk humana, ligados funcionalmente ao gene Ck de ratinho. Esta experiência foi repetida com grupos adicionais dos ratinhos descritos acima e apresentou resultados similares (resultados não apresentados).

Tabela 3

Genótipo	% células B	% Igκ⁺	% Igλ⁺
Tipo selvagem	46,2	91,0	3,6
12 hVλ+hJκ1	28,3	10,4	62,5
12 hVλ-VκJκ-hJλ1	12,0	11,0	67,5
12 hVλ-VκJκ-4hJλ	41,8	17,2	68,4
28 hVλ+hJλ1	22,0	13,3	51,1
40 hVλ+hJλ1	28,2	24,3	53,0

Tabela 4

Genótipo	% células B	% Igκ⁺	% Igλ⁺
Tipo selvagem	49,8	91,2	3,5
40 hVλ-VκJκ-4hJλ	33,3	41,6	43,1

Tabela 5

Genótipo	% células B	% células B maduras	% células B imaturas	% células B imaturas Igκ⁺	% células B imaturas Igλ⁺
Tipo selvagem	62,2	9,2	12,0	79,0	8,84
40hVλ-VκJκ-4hJλ	60,43	2,59	7,69	38,29	43,29

Utilização de genes Vλ humanos em ratinhos portadores de segmentos gênicos de cadeia leve λ humana. Ratinhos heterozigóticos para uma primeira inserção de sequências λ humanas (hVλ3-12-hVλ3-1 e hJλ1, FIG. 5B) e homozigóticos para uma terceira inserção de sequências λ humanas (hVλ5-52-hVλ3-1 e hJλ1, FIG. 5B) foram analisados quanto à utilização dos genes de cadeia leve λ humana por reação em cadeia da polimerase com recurso à transcriptase reversa (RT-PCR), utilizando ARN isolado de esplenócitos.

Resumidamente, os baços foram colhidos e perfundidos com 10 ml de meio RPMI-1640 (Sigma) contendo HI-FBS a 5% em sacos descartáveis estéreis. Cada saco contendo um baço único foi depois colocado num STOMACHER™ (Seward) e homogeneizado usando uma configuração média durante 30 segundos. Os baços homogeneizados foram filtrados usando um coador de células de 0,7 µm, depois foram depositados com uma centrífuga (1000 rpm durante 10 minutos) e os glóbulos vermelhos foram lisados em BD PHARM LYSE™ (BD Biosciences) durante três minutos. Os esplenócitos foram diluídos com RPMI-1640 e novamente centrifugados, seguidos de ressuspensão em 1 ml de PBS (Irvine Scientific). O ARN foi isolado a partir dos esplenócitos depositados utilizando técnicas padrão conhecidas na técnica.

A reação de RT-PCR foi efetuada no ARN dos esplenócitos, usando iniciadores específicos para os segmentos génicos hVλ humanos e o gene Ck de ratinho (Tabela 6). Os produtos de PCR foram purificados em gel, clonados no vetor pCR2.1-TOPO TA (Invitrogen) e sequenciados com os iniciadores M13 Direto (GTAAACGAC GGCCAG; SEQ ID NO: 55) e M13 Inverso (CAGGAAACAG CTATGAC; SEQ ID NO:56) que estão localizados no vetor em posições que flanqueiam o sítio de clonagem. Sequenciaram-se oitenta e quatro clones totais derivados da primeira e terceira inserções de sequências λ humanas para determinar a utilização dos genes hVλ (Tabela 7). A sequência nucleotídica da junção hVλ-hJλ1-mCk para clones de RT-PCR selecionados está apresentada na FIG. 11.

De forma idêntica, ratinhos homozigóticos para uma terceira inserção de sequências génicas de cadeia leve λ humana (isto é, 40 segmentos génicos hVλ e quatro segmentos génicos hJλ, incluindo uma sequência genómica Vk-Jk humana; final da FIG. 7B) ligadas funcionalmente ao gene Ck endógeno de ratinho foram analisados quanto à utilização dos genes de cadeia leve λ humana por RT-PCR, utilizando ARN isolado de esplenócitos (como descrito acima). A utilização dos segmentos génicos de cadeia leve λ humana para 26 clones de RT-PCR selecionados está apresentada na Tabela 8. A sequência nucleotídica da junção hVλ-hJλ-mCk para clones de RT-PCR selecionados está apresentada na FIG. 12.

De forma idêntica, ratinhos homozigóticos para uma primeira inserção de segmentos génicos de cadeia leve λ humana (12 segmentos génicos hV λ e hJ λ 1; FIG. 4A e FIG. 5A) ligados funcionalmente ao gene C λ 2 endógeno de ratinho foram analisados quanto à utilização dos genes de cadeia leve λ humana por RT-PCR, utilizando ARN isolado de esplenócitos (como descrito acima). Os iniciadores específicos para os segmentos génicos hV λ (Tabela 6) foram emparelhados com um dos dois iniciadores específicos para o gene C λ 2 de ratinho: C λ 2-1 (SEQ ID NO:104) ou C λ 2-2 (SEQ ID NO:105).

Observaram-se múltiplos segmentos génicos hV λ rearranjados para h λ 1 nos clones de RT-PCR de ratinhos portadores de segmentos génicos de cadeia leve λ humana ao nível do locus λ endógeno de cadeia leve de ratinho. A sequência nucleotídica da junção hV λ -hJ λ -mC λ 2 para clones de RT-PCR selecionados está apresentada na FIG. 13.

Tabela 6

5' Iniciador hV λ	Sequência (5'-3')	SEQ ID NO:
VLL-1	CCTCTCCTCC TCACCCTCCT	40
VLL-1n	ATGRCCDGST YYYCTCTCCT	41
VLL-2	CTCCTCACTC AGGGCACA	42
VLL-2n	ATGGCCTGGG CTCTGCTSCT	43
VLL-3	ATGGCCTGGA YCSCTCTCC	44
VLL-4	TCACCATGGC YTGGRYCYCM YTC	45
VLL-4.3	TCACCATGGC CTGGGTCTCC TT	46
VLL-5	TCACCATGGC CTGGAMTCYT CT	47
VLL-6	TCACCATGGC CTGGGCTCCA CTACTT	48
VLL-7	TCACCATGGC CTGGACTCCT	49
VLL-8	TCACCATGGC CTGGATGATG CTT	50
VLL-9	TAAATATGGC CTGGGCTCCT CT	51
VLL-10	TCACCATGCC CTGGGCTCTG CT	52
VLL-1	TCACCATGGC CCTGACTCCT CT	53

3'

Iniciador Cx
ratinho

Sequência (5'-3')

SEQ ID
NO:

mIgKC3'-1	CCCAAGCTTA CTGGATGGTG GGAAGATGGA	54
-----------	----------------------------------	----

Tabela 7

hVλ	N.º de clones observado
3-1	2
4-3	3
2-8	7
3-9	4
3-10	3
2-14	1
3-19	1
2-23	7
3-25	1
1-40	9
7-43	2
1-44	2
5-45	8
7-46	3
9-49	6
1-51	3

Tabela 8

Clone	hVλ	hJλ
1-3	1-44	7
1-5	1-51	3
2-3	9-49	7
2-5	1-40	1
2-6	1-40	7
3b-5	3-1	7
4a-1	4-3	7
4a-5	4-3	7
4b-1	1-47	3
5-1	3-10	3
5-2	1-40	7
5-3	1-40	7
5-4	7-46	2
5-6	1-40	7
5-7	7-43	3
6-1	1-40	1
6-2	1-40	2
6-7	1-40	3
7a-1	3-10	7
7a-2	9-49	2
7a-7	3-10	7
7b-2	7-43	3
7b-7	7-46	7
7b-8	7-43	3
11a-1	5-45	2
11a-2	5-45	7

A FIG. 11 ilustra a sequência da junção hV λ -hJ λ 1-mC κ para os clones de RT-PCR de ratinhos portadores de uma primeira e uma terceira inserção de segmentos génicos hV λ com um único

segmento génico hJ λ . As sequências apresentadas na FIG. 11 ilustram rearranjos únicos que envolvem diferentes segmentos génicos hV λ com o segmento hJ λ 1 recombinados com o gene Ck de ratinho. Os ratinhos heterozigóticos portadores de um único locus κ endógeno modificado, contendo 12 segmentos génicos hV λ e o segmento hJ λ 1, e os ratinhos homozigóticos portadores de dois loci κ endógenos modificados, contendo 40 segmentos génicos hV λ e o segmento hJ λ 1, foram ambos capazes de produzir segmentos génicos λ humanos ligados funcionalmente ao gene Ck de ratinho e de produzir células B que expressaram as cadeias leves λ humanas. Estes rearranjos demonstram que os loci quiméricos foram capazes de rearranjar, de modo independente, os segmentos génicos λ humanos em múltiplas células B independentes nestes ratinhos. Além disso, estas modificações ao nível do locus κ endógeno de cadeia leve não tornaram nenhum dos segmentos génicos hV λ inoperativo nem impediram que o locus quimérico recombinasse múltiplos segmentos hV λ e um segmento génico hJ λ (J λ 1) durante o desenvolvimento das células B, conforme evidenciado pela observação de que 16 segmentos génicos hV λ diferentes se rearranjaram com hJ λ 1 (Tabela 7). Adicionalmente, estes ratinhos produziram anticorpos funcionais contendo segmentos génicos V λ -J λ humanos rearranjados ligados funcionalmente a genes Ck de ratinho, como parte do repertório de cadeias leves de imunoglobulina endógenas.

A FIG. 12 ilustra a sequência da junção hV λ -hJ λ -mCk para clones de RT-PCR selecionados de ratinhos homozigóticos para 40 segmentos génicos hV λ e quatro segmentos génicos hJ λ , que incluem uma sequência genómica V κ -J κ humana. As sequências apresentadas na FIG. 12 ilustram rearranjos adicionais que envolvem múltiplos segmentos génicos hV λ diferentes, abrangendo todo o locus quimérico, com múltiplos segmentos génicos hJ λ diferentes rearranjados e ligados funcionalmente ao gene Ck de ratinho. Os ratinhos homozigóticos portadores de loci κ endógenos modificados, contendo 40 hV λ e quatro segmentos génicos hJ λ , também foram capazes de produzir segmentos génicos λ humanos ligados funcionalmente ao gene Ck de ratinho e de produzir células B que expressaram as cadeias leves λ humanas. Estes rearranjos demonstram ainda que todas as fases dos loci quiméricos foram capazes de rearranjar, de modo independente, os segmentos génicos λ humanos em múltiplas

células B independentes nestes ratinhos. Além disso, estas modificações adicionais ao nível do locus κ endógeno de cadeia leve demonstram que cada inserção de segmentos génicos λ humanos não tornou nenhum dos segmentos génicos hV λ e/ou J λ inoperativo nem impediu que o locus quimérico recombinasse os segmentos génicos hV λ e J λ durante o desenvolvimento das células B, conforme evidenciado pela observação de que 12 segmentos génicos hV λ diferentes se reorganizaram com todos os quatro segmentos génicos hJ λ (Tabela 8) dos 26 clones de RT-PCR selecionados. Adicionalmente, estes ratinhos também produziram anticorpos funcionais contendo segmentos génicos V λ -J λ humanos ligados funcionalmente a regiões C κ de ratinho, como parte do repertório de cadeias leves de imunoglobulina endógenas.

A FIG. 13 ilustra a sequência da junção hV λ -hJ λ -mC λ 2 para três clones de RT-PCR individuais de ratinhos homozigóticos para 12 segmentos génicos hV λ e o segmento génico hJ λ 1. As sequências apresentadas na FIG. 13 ilustram rearranjos únicos adicionais que envolvem diferentes segmentos génicos hV λ , abrangendo o comprimento da primeira inserção, com o segmento hJ λ 1 rearranjados e ligados funcionalmente ao gene C λ 2 de ratinho (2D1 = V λ 2-8J λ 1; 2D9 = V λ 3-10J λ 1; 3E15 = V λ 3-1J λ 1). Um clone mostrou um rearranjo não produtivo devido a adições N ao nível da junção hV λ -hJ λ (2D1, FIG.13). Este facto não é invulgar na recombinação V(D)J, uma vez que a união dos segmentos génicos durante a recombinação mostrou ser imprecisa. Embora este clone represente um recombinante não produtivo que está presente no repertório de cadeias leves destes ratinhos, isto demonstra que o mecanismo genético que contribui para a diversidade juncional entre os genes de anticorpos está a funcionar normalmente nestes ratinhos e a conduzir a um repertório de anticorpos contendo cadeias leves com maior diversidade.

Os ratinhos homozigóticos portadores de loci λ endógenos modificados, contendo 12 segmentos génicos hV λ e o segmento hJ λ 1, também foram capazes de produzir segmentos génicos λ humanos ligados funcionalmente a um gene C λ endógeno de ratinho e de produzir células B que expressaram cadeias leves λ quiméricas inversas contendo regiões hV λ ligadas a regiões C λ de ratinho. Estes rearranjos demonstram ainda que os segmentos

génicos de cadeia leve λ humana colocados ao nível do outro locus de cadeia leve (isto é, o locus λ) foram capazes de rearranjar, de modo independente, os segmentos génicos λ humanos em múltiplas células B independentes nestes ratinhos. Além disso, as modificações ao nível do locus λ endógeno de cadeia leve demonstram que a inserção de segmentos génicos λ humanos não tornou nenhum dos segmentos génicos hV λ e/ou hJ λ 1 inoperativo nem impediu que o locus quimérico recombinasse os segmentos génicos hV λ e hJ λ 1 durante o desenvolvimento das células B. Adicionalmente, estes ratinhos também produziram anticorpos funcionais contendo segmentos génicos V λ -J λ humanos ligados funcionalmente a uma região C λ de ratinho, como parte do repertório de cadeias leves de imunoglobulina endógenas.

Como ilustrado neste Exemplo, os ratinhos portadores de segmentos génicos de cadeia leve λ humana ao nível dos loci κ e λ endógenos de cadeia leve são capazes de rearranjar os segmentos génicos de cadeia leve λ humana e de expressá-los no contexto de uma região C κ e/ou C λ de ratinho como parte do repertório de anticorpos normal do ratinho, pois é necessária uma cadeia leve funcional em vários pontos do desenvolvimento das células B tanto no baço como na medula óssea. Além disso, os subconjuntos precoces de células B (por exemplo, as células pré-B, pró-B e B transicionais) demonstram um fenótipo normal nestes ratinhos em comparação com os animais de tipo selvagem da mesma ninhada (FIGS. 9D, 10A e 10B). Observou-se um pequeno défice nas populações de células B periféricas e da medula óssea, o que poderá ser atribuído a uma eliminação de um subconjunto de células B imaturas autorreativas e/ou a uma associação subótima da cadeia leve λ humana com a cadeia pesada de ratinho. Contudo, a utilização Ig κ /Ig λ observada nestes ratinhos revela uma situação que é mais semelhante à expressão de cadeias leves humana do que à observada nos ratinhos.

Exemplo VI

Cruzamento de ratinhos que expressam cadeias leves λ humanas a partir de um locus endógeno de cadeia leve

Para otimizar a utilização dos segmentos génicos λ humanos ao nível de um locus endógeno de cadeia leve de ratinho, os ratinhos portadores dos segmentos génicos λ humanos não

rearranjados são cruzados com outro ratinho que contém uma deleção no locus endógeno de cadeia leve oposto (κ ou λ). Por exemplo, os segmentos génicos λ humanos posicionados no locus κ endógeno seriam os únicos segmentos génicos de cadeia leve funcionais presentes num ratinho que também transportasse uma deleção no locus λ endógeno de cadeia leve. Desta forma, a descendência obtida expressaria apenas cadeias leves λ humanas como descrito nos exemplos precedentes. O cruzamento é efetuado por técnicas padrão reconhecidas na técnica e, em alternativa, por companhias comerciais, por exemplo, The Jackson Laboratory. As estirpes de ratinho portadoras de segmentos génicos de cadeia leve λ humana no locus κ endógeno e de uma deleção do locus λ endógeno de cadeia leve são rastreadas quanto à presença das cadeias leves λ quiméricas (humanas-ratinho) inversas únicas e à ausência de cadeias leves λ endógenas de ratinho.

Os ratinhos portadores de um locus de cadeia leve λ humano não rearranjado também são cruzados com ratinhos que contêm uma substituição do locus endógeno de genes variáveis de cadeia pesada de ratinho pelo locus de genes variáveis de cadeia pesada humano (ver US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, o ratinho geneticamente manipulado VELOCIMMUNE®). O ratinho VELOCIMMUNE® inclui, em parte, possuir um genoma que compreende regiões variáveis de cadeia pesada humana ligadas funcionalmente a loci endógenos de região constante de ratinho, de forma que o ratinho produz anticorpos compreendendo uma região variável de cadeia pesada humana e uma região constante de cadeia pesada de ratinho em resposta à estimulação antigénica. O ADN que codifica as regiões variáveis de cadeia pesada dos anticorpos pode ser isolado e ligado funcionalmente ao ADN que codifica as regiões constantes de cadeia pesada humana. O ADN pode depois ser expresso numa célula capaz de expressar a cadeia pesada totalmente humana do anticorpo. Mediante um esquema de cruzamento adequado, obtêm-se ratinhos que transportam uma substituição do locus endógeno de cadeia pesada de ratinho pelo locus de cadeia pesada humano e um locus de cadeia leve λ humano não rearranjado ao nível do locus κ endógeno de cadeia leve. Anticorpos contendo regiões variáveis de cadeia pesada humana mutadas somaticamente e regiões variáveis de cadeia leve λ humana podem ser isolados mediante imunização com um antigénio de interesse.

Exemplo VII

Geração de anticorpos a partir de ratinhos que expressam cadeias pesadas humanas e cadeias leves λ humanas

Após o cruzamento de ratinhos que contêm o locus de cadeia leve λ humano não rearranjado com várias estirpes desejadas contendo modificações e deleções de outros loci endógenos de imunoglobulina (como descrito acima), os ratinhos selecionados são imunizados com um antígeno de interesse.

Geralmente, um ratinho VELOCIMUNE® contendo uma das regiões de cadeia leve da linha germinal humana rearranjada é provocado com um antígeno, e as células linfáticas (como as células B) são recuperadas do soro dos animais. As células linfáticas poderão ser fundidas com uma linha celular de mieloma para preparar linhas celulares de hibridoma imortais, e estas linhas celulares de hibridoma são rastreadas e selecionadas para identificar as linhas celulares de hibridoma que produzem anticorpos contendo uma cadeia pesada humana e uma cadeia leve λ humana que são específicos para o antígeno usado na imunização. O ADN que codifica as regiões variáveis das cadeias pesadas e das cadeias leves λ poderá ser isolado e ligado a regiões constantes isotípicas desejáveis de cadeia pesada e de cadeia leve. Devido à presença dos segmentos gênicos hV λ adicionais em comparação com o locus λ endógeno de ratinho, a diversidade do repertório de cadeias leves é dramaticamente aumentada e confere maior diversidade ao repertório específico para o antígeno no seguimento da imunização. As sequências do anticorpo clonado resultante poderão ser subsequentemente produzidas numa célula, como seja uma célula CHO. Em alternativa, o ADN que codifica os anticorpos quiméricos específicos para o antígeno ou os domínios variáveis das cadeias leve e pesada poderá ser isolado diretamente a partir de linfócitos específicos para o antígeno (por exemplo, células B).

Inicialmente, isolam-se os anticorpos quiméricos de alta afinidade possuindo uma região variável humana e uma região constante de ratinho. Como descrito acima, os anticorpos são caracterizados e selecionados em termos de características

desejáveis, incluindo a afinidade, a seletividade, o epitopo, etc. As regiões constantes de ratinho são substituídas por uma região constante humana desejada, para gerar o anticorpo totalmente humano contendo uma cadeia pesada humana mutada somaticamente e uma cadeia leve λ humana derivada de um locus de cadeia leve λ humano não rearranjado do invento. As regiões constantes humanas adequadas incluem, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 de tipo selvagem ou modificadas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Macdonald, Lynn
 Stevens, Sean
 Gurer, Cagan
 Murphy, Andrew J.
 Hosiawa, Karolina A.

<120> RATINHOS COM CADEIA LEVE HÍBRIDA

<130> 795A-WO

<140> A atribuir

<141>

<150> 61/357,314

<151> 2010-06-22

<150> 61/357,317

<151> 2010-06-22

<160> 105

<170> FastSEQ para Windows, Versão 4.0

<210> 1

<211> 219

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 1

```
actttcagaa tggtcttgaa cagtctctga gaaacacgga agacggccgc ataacttcgt 60
atagtataca ttatacgaag ttattctaga cccccgggct cgataactat aacggtccta 120
aggtagcgac tcgagataac ttcgtataat gtatgctata cgaagttatc catggttaagc 180
ttacgtggca tacagtgtca gattttctgt ttatcaagc 219
```

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 2

agctgaatgg aaacaaggca a

21

<210> 3

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 3

ggagacaatg ccccgatga

19

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 4

tcccataggg ctaggatttc c

21

<210> 5

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 5

tcccctcaca ctgttcccc

19

<210> 6

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 6

ggtggagagg ctattcggc

19

<210> 7

<211> 17

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 7

gaacacggcg gcatcag

17

<210> 8

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 8

tcaacctttc ccagcctgtc t

21

<210> 9

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 9

ccccagagag agaaaacaga tttt

24

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 10
ccctggtgaa gcatgtttgc 20

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 11
tgtggcctgt ctgccttacg 20

<210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 12
cacacctaga ccccggaagt c 21

<210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 13 tcgctttgcc agttgattct c	21
<210> 14 <211> 17 <212> ADN <213> Sequência artificial	
<220> <223> Sintética	
<400> 14 tgcggccgat cttagcc	17
<210> 15 <211> 18 <212> ADN <213> Sequência artificial	
<220> <223> Sintética	
<400> 15 ttgaccgatt ccttgcg	18
<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Sequência artificial	
<220> <223> Sintética	
<400> 16 gcaaacaaaa accactggcc	20
<210> 17 <211> 19 <212> ADN <213> Sequência artificial	

<220>

<223> Sintética

<400> 17

ggccacattc catgggttc

19

<210> 18

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 18

ccatgactgg gcctctgtag ac

22

<210> 19

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 19

caagtcaggg tgctaatgct gtatc

25

<210> 20

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 20

cacagcttgt gcagcctcc

19

<210> 21

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 21

gggcactgga tacgatgtat gg

22

<210> 22

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 22

tcataggtag gtctcagttt g

21

<210> 23

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 23

tgatctgcgc tgtttcatcc t

21

<210> 24

<211> 31

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 24

tgacatgaac catctgtttc tctctcgaca a

31

<210> 25
<211> 29
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 25
agagacgctc cgaggtcaag gtgctctag 29

<210> 26
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 26
tgggcacaac agacaatcgg ctg 23

<210> 27
<211> 16
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 27
accctctgct gtcctt 16

<210> 28
<211> 26
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 28 ccaagcagga ggtgctcagt tcccaa	26
<210> 29 <211> 24 <212> ADN <213> Sequência artificial	
<220> <223> Sintética	
<400> 29 tccacactgt cggctgggag ctca	24
<210> 30 <211> 21 <212> ADN <213> Sequência artificial	
<220> <223> Sintética	
<400> 30 acgagcgggt tcggcccatt c	21
<210> 31 <211> 37 <212> ADN <213> Sequência artificial	
<220> <223> Sintética	
<400> 31 ctgttcctct aaaactggac tccacagtaa atggaaa	37
<210> 32 <211> 27 <212> ADN <213> Sequência artificial	

<220>

<223> Sintética

<400> 32

tgccgcttat acaacactgc catctgc

27

<210> 33

<211> 37

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 33

agaagaagcc tgtactacag catccgtttt acagtca

37

<210> 34

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 34

gggctacttg aggaccttgc t

21

<210> 35

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 35

gacagccctt acagagtttg gaa

23

<210> 36

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 36

aagaccagga gctctgccta agt

23

<210> 37

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 37

cccatcacga actgaagttg ag

22

<210> 38

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 38

cagggcctcc atcccaggca

20

<210> 39

<211> 28

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 39

ccccagtgtg tgaatcactc taccctcc

28

<210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 40
cctctcctcc tcaccctcct

20

<210> 41
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<221> variação
<222> (4)...(4)
<223> r=a ou g

<220>
<221> variação
<222> (9)...(9)
<223> s=c ou g

<220>
<221> variação
<222> 11, 12, 13
<223> y=c ou t

<400> 41
atgrccdgst yyctctcct

20

<210> 42
<211> 18
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 42
ctcctcactc agggcaca 18

<210> 43
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<221> variação
<222> (18)...(18)
<223> s=c ou g

<400> 43
atggcctggg ctctgctsct 20

<210> 44
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<221> variação
<222> (11)...(11)
<223> y=c ou t

<220>
<221> variação
<222> (13)...(13)
<223> s=c ou g

<400> 44
atggcctgga ycsctctcc 19

<210> 45
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<221> variação

<222> 11, 16, 18, 21

<223> y=c ou t

<220>

<221> variação

<222> (15)...(15)

<223> r=a ou g

<220>

<221> variação

<222> (20)...(20)

<223> m=a ou c

<400> 45

tcaccatggc ytggrycycm ytc

23

<210> 46

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 46

tcaccatggc ctgggtctcc tt

22

<210> 47

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<221> variação

<222> (16)...(16)

<223> m=a ou c

<220>

<221> variação

<222> (19)...(19)

<223> y=c ou t

<400> 47	
tcaccatggc ctggamtcyt ct	22
<210> 48	
<211> 26	
<212> ADN	
<213> Sequência artificial	
<220>	
<223> Sintética	
<400> 48	
tcaccatggc ctgggctcca ctactt	26
<210> 49	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Sequência artificial	
<220>	
<223> Sintética	
<400> 49	
tcaccatggc ctggactcct	20
<210> 50	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Sequência artificial	
<220>	
<223> Sintética	
<400> 50	
tcaccatggc ctggatgatg ctt	23
<210> 51	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Sequência artificial	

<220>

<223> Sintética

<400> 51

taaatatggc ctgggctcct ct

22

<210> 52

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 52

tcaccatgcc ctgggctctg ct

22

<210> 53

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 53

tcaccatggc cctgactcct ct

22

<210> 54

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 54

cccaagctta ctggatggtg ggaagatgga

30

<210> 55

<211> 16

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 55

gtaaaaacgac ggccag

16

<210> 56

<211> 17

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 56

caggaaacag ctatgac

17

<210> 57

<211> 440

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 57

```

gggcctgggc tctgctgctc ctcacctcc tctctcaggg cacagggtcc tgggcccagt 60
ctgccctgac tcagcctccc tccgcgtccg ggtctcctgg acagtcagtc accatctcct 120
gcactggaac cagcagtgac gttggtggtt ataactatgt ctctgggtac caacagcacc 180
caggcaaagc ccccaaactc atgatttatg aggtcagtaa gcggccctca ggggtccctg 240
atcgcttctc tggctccaag tctggcaaca cggcctccct gaccgtctct gggctccagg 300
ctgaggatga ggctgattat tactgcagct catatgcagg cagcaacaat ttcgtcttcg 360
gaactgggac caaggtcacc gtccataggg ctgatgctgc accaactgta tccatcttcc 420
caccatccag taagcttggg                                     440

```

<210> 58

<211> 441

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 58

```

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc ggggtctctg gacagtcagt caccatctcc 120
tgcaactggaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaag cccccaact catgatttat gaggtcacta agcgccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtaagcttgg g 441

```

<210> 59

<211> 441

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 59

```

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc ggggtctctg gacagtcagt caccatctcc 120
tgcaactggaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaag cccccaact catgatttat gaggtcagta agcgccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtaagcttgg g 441

```

<210> 60

<211> 438

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 60

```

atggcctggg ctctgctcct caccctctct actcagggca cagggtcctg ggcccagtct 60
gccctgactc agcctccctc cgcgtccggg tctcctggac agtcagtcac catctcctgc 120
actggaacca gcagtgcagt tggtggttat aactatgtct cctggtacca acagcaccca 180
ggcaaagccc ccaaactcat gatttatgag gtcagtaagc ggccctcagg ggtccctgat 240
cgcttctctg gctccaagtc tggcaacacg gcctccctga ccgtctctgg gctccaggct 300
gaggatgagg ctgattatta ctgcagctca tatgcaggca gcaacaatta tgtcttcgga 360
actgggacca aggtcacctg cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420
ccatccagta agcttggg 438

```

<210> 61

<211> 438

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 61

```

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggccccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctcgcgctcc gggctcctcg gacagtcagt caccatctcc 120
tgcaactggaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaaag ccccccact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa tgtcttcgga 360
actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgtgcac caactgtatc catcttccca 420
ccatccagta agcttggg                                     438

```

<210> 62

<211> 441

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 62

```

atggcctggg ctctgctcct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggccccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctcgcgctcc gggctcctcg gacagtcagt caccatctcc 120
tgcaactggaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaaag ccccccact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtaagcttgg g                                     441

```

<210> 63

<211> 442

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 63

```

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggccccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctcgcgctcc gggctcctcg gacagtcagt caccatctcc 120
tgcaactggaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaaag ccccccact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
cggaactggg accaaggtca ccgtcctagg ggctgatgct gaccaactg tatccatctt 420
cccaccatcc agtaagcttg gg                                     442

```

<210> 64

<211> 428

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 64

```

ccttcatttt ctccacaggt ctctgtgtct tgccctgtgt gactcagccc ccgtctgcat 60
ctgccttgct gggagcctcg atcaagctca cctgcaccct aagcagttag cacagcacct 120
acaccatcga atggtatcaa cagagaccag ggaggtcccc ccagtatata atgaaggta 180
agagtgtatg cagccacagc aagggggacg ggatccccga tcgtttcatg ggctccagtt 240
ctggggctga ccgtacctc accttctcca acctccagtc tgacgatgag gctgagtatc 300
actgtggaga gagccacacg attgatggcc aagtcggttg tgtcttcgga actgggacca 360
aggtcaccgt cctaggggct gatgtgtcac caactgtatc catcttccca ccatccagta 420
agcttggg                                     428

```

<210> 65

<211> 441

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 65

```

atgacctgct cccctctcct cctcaccctt ctcattcaact gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgtgttga cgcagccgcc ctcaagtgtct gcggccccag gacagaaggt caccatctcc 120
tgctctggaa gcagctccaa cattgggaat aattatgtat cctggtacca gcagctccca 180
ggaacagccc ccaaactcct catttatgac aataataagc gacctcagg gattcctgac 240
cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcaccgg actccagact 300
ggggacgagg ccgattatta ctgcggaaca tgggatatga gcctgagtgc ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaagggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtgagcagtt a                                     441

```

<210> 66

<211> 441

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 66

```

atgacctgct cccctctcct cctcaccctt ctcattcaact gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgtgttga cgcagccgcc ctcaagtgtct gcggccccag gacagaaggt caccatctcc 120
tgctctggaa gcagctccaa cattgggaat aattatgtat cctggtacca gcagctccca 180
ggaacagccc ccaaactcct catttatgac aataataagc gacctcagg gattcctgac 240
cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcaccgg actccagact 300
ggggacgagg ccgattatta ctgcggaaca tgggatatga gcctgagtgc ggcttttttt 360
ggaactggga ccaagggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtgagcagtt a                                     441

```

<210> 67
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 67
 cccgggcaga gggtcacat ctctgttct ggaagcagct ccaacatcg aagtaatact 60
 gtaaaactggt accagcagct cccaggaacg gccccaaac tcctcatcta tagtaataat 120
 cagcggccct caggggtccc tgaccgattc tctggctcca agtctggcac ctcagcctcc 180
 ctggccatca gtgggtcca gtctgaggat gaggtgatt attactgtgc agcatgggat 240
 gacagcctga atgggttatgt cttcggaact gggaccaagg tcaccgtcct aggggctgat 300
 gctgcaccaa ctgtatccat ctteccacca tccagtgagc agtta 345

<210> 68
 <211> 432
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 68
 atggcctgga cccctctcct gtcgccctc ctcactttct gcacagtctc tgaggcctcc 60
 tatgagctga cacagccacc ctcggtgtca gtgtccccag gacaaacggc caggatcacc 120
 tgctctggag atgcattgcc aaaaaaatat gcttatttgt accagcagaa gtcaggccag 180
 gccctgtgc tgggtcatcta tgaggacagc aaacgacct ccgggatccc tgagagattc 240
 tctggctcca gtcaggagc aatggccacc ttgactatca gtggggccca ggtggaggat 300
 gaagctgact actactgtta ctcaacagac tacagtggta atcatgtctt cggaactggg 360
 accaaggtca ccgtcctagg ggctgatget gcaccaactg tatccatctt cccaccatcc 420
 agtgagcagt ta 432

<210> 69
 <211> 426
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 69
 atggcctgga ctcctctctt tctgttcctc ctcacttgct gccagggtc caattcccag 60
 gctgtggtga ctcaggagcc ctcactgact gtgtccccag gagggacagt cactctcacc 120
 tgttgctcca gcactggagc tgcaccagt ggtcattatc cctactggtt ccagcagaag 180
 cctggccaag cccccaggac actgatttat gatacaagca acaaacactc ctggacacct 240
 gcccggttct caggetccct ccttgggggc aaagctgccc tgaccetttc ggggtgcgag 300
 cctgaggatg aggetgagta ttactgcttg ctctcctata gtggtgctta tgtcttcgga 360
 actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgtgcac caactgtatc catcttccca 420
 ccatcc 426

<210> 70

<211> 331

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 70

```

agtggctcctg ggacagacgg ccaggattac ctgtggggga aacaacattg gaagtaaaaa 60
tgtgcaactgg taccagcaga agccaggcca ggcccctgtg ctggtcctct atagggataa 120
caaccggccc tctgggatcc ctgagcgatt ctctggctcc aactcgggga acacggccac 180
cctgaccatc agcagagccc aagccgggga tgaggctgac tattactgtc aggtgtggga 240
cagcagcact tatgtcttcg gaactgggac caaggtcacc gtcctagggg ctgatgctgc 300
accaactgta tccatcttcc caccatccag t

```

<210> 71

<211> 417

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 71

```

actcctctcc tctcctgtt cctctctcac tgcacagggt cctctctgca ggctgtgctg 60
actcagccgt ctccctctc tgcctctcct ggagcatcag ccagtctcac ctgcaccttg 120
cgcagtggca tcaatgttgg tacctacagg atatactggt accagcagaa gccaggaggt 180
cctccccagt atctcctgag gtacaaatca gactcagata agcagcaggg ctctggagtc 240
cccagccgt tctctggatc caaagatgct tcggccaatg cagggatttt actcatctct 300
gggctccagt ctgaggatga ggctgactat tactgtatga tttggcacag cagcgcttat 360
gtcttcggaa ctggggacaa ggtcacgctc ctaggggctg atgctgcacc aactgta 417

```

<210> 72

<211> 393

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 72

```

tttctgttcc tctcacttg ctgccaggg tccaattctc agactgtggt gactcaggag 60
ccctcactga ctgtgtcccc aggagggaca gtcactctca cctgtgcttc cagcactgga 120
gcagtcacca gtggttacta tccaaactgg ttccagcaga aacctggaca agcaccaggg 180
gcactgattt atagtacaag caacaaacgc tctggaccc ctgccgggt ctcaggctcc 240
ctccttgggg gcaaagctgc cctgacactg tcagggtgtc agcctgagga cgaggctgag 300
tattactgcc tgctctacta tgggtgtgct tatgtcttcg gaactgggac caaggtcacc 360
gtcctagggg ctgatgctgc accaactgta tcc

```

<210> 73
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 73
 atggcctggg ctctgctgct cctcactctc ctcactcagg acacagggtc ctgggccag 60
 tctgccctga ctcagcctgc ctccgtgtct gggctcctg gacagtcgat caccatctcc 120
 tgcactggaa ccagcagtga tgttgggagt tataaccttg tctcctggta ccaacagcac 180
 ccaggcaaag cccccaact catgatttat gagggcagta agcggccctc aggggtttct 240
 aatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgacaatctc tgggctccag 300
 gctgaggacg aggctgatta ttactgctgc tcatatgcag gtagtagcac ttatgtcttc 360
 ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatc 417

<210> 74
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 74
 cagtcctgcc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
 tcttgcactg gaaccagcag tgacgttggg ggttataact atgtctcctg gtaccaacag 120
 caccagga aagccccaa actcatgatt tatgaggta gtaatcggcc ctcaggggtt 180
 tctaactcgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct cctgacat ctctgggctc 240
 caggctgagg acgaggctga ttattactgc agtcatata caagcagcag cacttatgtc 300
 ttcggaactg ggaccaaggt caccggcctg ggggctgatg ctgcacca 348

<210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 75
 aacaaccgag ctccaggtgt

20

<210> 76
 <211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 76

agggcagcct tgtctccaa

19

<210> 77

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 77

cctgccagat tctcaggctc

20

<210> 78

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 78

catcacaggg gcacagactg

20

<210> 79

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 79

gatttgctga gggcaggggt

19

<210> 80
<211> 21
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 80
ccccaagtct gatccttcct t 21

<210> 81
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 81
gctgaccaac gatcgcctaa 20

<210> 82
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 82
taagcgccac actgcacct 19

<210> 83
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 83 cctgccagat tctcaggctc cctg	24
<210> 84 <211> 23 <212> ADN <213> Sequência artificial	
<220> <223> Sintética	
<400> 84 ctgattggag acaaggctgc cct	23
<210> 85 <211> 30 <212> ADN <213> Sequência artificial	
<220> <223> Sintética	
<400> 85 ccttcatact cttgcatcct cccttctcca	30
<210> 86 <211> 35 <212> ADN <213> Sequência artificial	
<220> <223> Sintética	
<400> 86 ttccttctct tctgtgactc aattatttgt ggaca	35
<210> 87 <211> 159 <212> ADN <213> Sequência artificial	

<220>

<223> Sintética

<400> 87

```
tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttctgtgt tcggaggagg caccaggctg 120
accgccctcg gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
```

<210> 88

<211> 159

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 88

```
tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttatgtct tcggaactgg gaccaaggctc 120
accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
```

<210> 89

<211> 159

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 89

```
tctggcacct cagcctccct ggccatcagt gggctccagt ctgaggatga ggctgattat 60
tactgtgcag catgggatga cagcctgaat ggtgctgtgt tcggaggagg caccagctg 120
accgccctcg gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
```

<210> 90

<211> 159

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 90

```
tctggcacct cagcctccct ggccatcagt gggctccggt ccgaggatga ggctgattat 60
tactgtgcag catgggatga cagcctgagt ggtcgggtgt tcggcggagg gaccaagctg 120
accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
```

<210> 91
<211> 153
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 91
tcggggaaca cggccaccct gaccatcagc agagcccaag ccgggggatga ggctgactat 60
tactgtcagg tgtgggacag cagcactgct gtgttcggag gaggcaccca gctgaccgcc 120
ctcggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153

<210> 92
<211> 156
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 92
tcagggaaca tggccacctt gactatcagt ggggcccagg tggaggatga agctgactac 60
tactgttact caacagacag cagtggtaat gctgtgttcg gagggaggac ccagctgacc 120
gccctcgggg ctgatgctgc accaactgta tccatc 156

<210> 93
<211> 159
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 93
tcagggaaca tggccacctt gactatcagt ggggcccagg tggaggatga agctgactac 60
tactgttact caacagacag cagtggtaat catagggtgt tcggcggagg gaccaagctg 120
accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 94
<211> 159
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 94

```
tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttatgtct tcggaactgg gaccaaggct 120
accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
```

<210> 95

<211> 159

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 95

```
gatgcttcgg ccaatgcagg gattttactc atctctgggc tccagtctga ggatgaggct 60
gactattact gtatgatttg gcacagcagc gctgtggtat tcggcggagg gaccaaggct 120
accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
```

<210> 96

<211> 153

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 96

```
cttgggggca aagctgccct gacctgtcga ggtgtgcagc ctgaggacga ggctgagtat 60
tactgcttgc tctactatgg tgggtctcgg gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc 120
ctaggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153
```

<210> 97

<211> 153

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 97

```
cttgggggca aagctgccct gaccttttcg ggtgtgcagc ctgaggatga ggctgagtat 60
tactgcttgc tctcctatag tgggtctcga gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc 120
ctaggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153
```


<210> 98
<211> 165
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 98
tcaggcctga atcggtacct gaccatcaag aacatccagg aagaggatga gagtgactac 60
cactgtgggg cagacccatgg cagtgggagc aacttcgtgt ctgtgttcgg aggaggcacc 120
cagctgaccg ccctcggggc tgatgctgca ccaactgtat ccatc 165

<210> 99
<211> 164
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 99
tctggcacgt cagccaccct gggcatcacc ggactccaga ctggggacga ggccgattat 60
tactgcggaa catgggatag cagcctgagt gctggccccg ggtgttcggc ggagggacca 120
agctgaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catc 164

<210> 100
<211> 22800
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 100

```

aagctctaaa actacaaact gctgaaagat ctaatgacta ggacagccta gtaattttca 60
taggggcata aatgtgaaac gccttgtgca tcgtagaaga aagcagaaga gaaagcattc 120
ccaatttctt aactgccttt tacctatatt aatcagtaat atactggctt ttacctctgt 180
taatcataat aaacaaattc tcaataaatt ttatcgatac tcttcaatgc ctgctcagca 240
acattttccg aaggcagctc aagatattaa ataactcata agggccaacc tcctattgca 300
gcattctttg ggatttaacc agtttcccaa gactcttttc acaatgttaa gatgttagaa 360
atagatccaa aactagggtga tatatcccct agtaaaaactg tgagggtcaaa cttgtctggc 420
taatgcttcc atttaaaaat ttctctttct tgatccttca ttgtatgtac acaataaatc 480
aggggaaaaa tttaactgag tgaatcaaag tattctcatt attataatag gagcttcaca 540
cacacacaaa aaaatcaatt ctattactct cagcctcagt tcctaaagcc aagttaaagt 600
cctgttctaa gatcattgtt gcatgaccat atgtattcca ggtctaatct aaactgtgga 660
taaattcccag caggacatta gagatttttg tgagagtaag catataggat tcagggttta 720
tgagcttttag atttttcttg tcaaaatgaa tgagagttgc catatctaaa aattattccc 780
agataaataa aattcactac ctagaattaa tttatgcata taagtagaaa tgctatctcc 840
ctttttacca tccaaagtgg aaagcctcat ggaactagaa attaatatta gaaaaatcag 900
ttaataaaaag tatgtcattt catcaattca ataagttata atagcaaaaa accataataa 960
attatcactt aaatgtcaat acatttataa actatggtac ataaatagga tattgaatag 1020
ccattgatgc tcctgatgaa aattagcagg cagtataaaa tgataaatat gaagcacatg 1080
tcaataaata aaataagttt tatgtaattt aggagaaaat ggtgataatg acacaaaatg 1140
tgaattatgg atgcatctat aaaattcttt gtacatttgt gaattgtaaa tatttatctt 1200
agagacatta ttacttttga tatgttccat ttgctcacct atatgtccca gtctccttac 1260
aaatgctatg gccaaagaaa taggcataca tacatccttt gcaggctgag gcaggaaaaa 1320
gatcttaagg aattttccag tctatccttt atctgtataa gcaacttaag aggccatgtg 1380
ctccaaatgg tgcaaataca agatggtaga gcctctgtct gcctggatcc ttgagtggtc 1440
gcatggagca gagcaccttt ctggccctgg tgaagattgt agcatgagca agatataagc 1500
atttgttggg gctaggccat gagatttggg gcagtgggat aacctaccct attatggaaa 1560
atataaatac acaaaacaga aaagagagag aqaagtgaga gaagactgtg agagaagtgc 1620
atgagagaa actgtgtttt gttcatttcc tataatccta tatcaccatg ggatcctgtg 1680
ccttctgggt atcaaaactaa tgttctacag ctccaaagaa gaatgctcgc ctaacgtctc 1740
cattccaatg acctagagac taaaagccaa aaagaacctt agaaattatc tattgcattc 1800
tttgatgtaa ggaaatatct tagagggcac agatagaaat atcttaaccc aggtcactta 1860

```

```

gttcgtggca gagctgaggg taaaaccagg ctttttgact cctaattttg tgctctttac 1920
accttctcac atcacttctc caacccaaag tctagcagaa aaggctaaaa taagatatat 1980
gcatagatatt gctattataa gtccatgtac ttctcagac gctttaagat ggggctcttc 2040
atggttcaca ataagcagca gagggaaagt aataactatc ttctgtctcc ctactgctat 2100
ttgtgcagtt tgaagcttat ctcttaaate atgttttctt ctctgtagta atactacaac 2160
ttgtgccttt tatgtgtgta taaattttta tataattttt ttccatgaac cattcaagta 2220
aaatggacac tccaaaaaga tgttcaataa ggttacatgg cttcacattg cccctctac 2280
accatcttgt ggagctacac attcacctca ccaaatttg agaaaaataa tcaagaaaat 2340
gactctcact agcagtgaga ccaagtcctt aagcactaat gtcatcagt cactctgag 2400
cctcatgctg ccaagcatgt ttgggggta tccctggact ggtttggtga catgatcaaa 2460
ggtacatttt ccacctgcac agccccatcc tggatctata gccttcttg tgtctttgtg 2520
aacaacctag tgtgaactca aagtatgaga cagatctcaa ttaatttaga aagtttattt 2580
tcccaagatt aaggacaagg ccatgataaa gcctccagag gtctgatat atgtgccaa 2640
gggggtcggg gcacagcttg gtgttatata tttagggag acaagaaaca tcaatcgata 2700
tgtagaagat gtgcacgct ttgggtctga aaggtgtgac aactcaaggc aggggaagg 2760
gcttctgtct ggggttgcat tgttttgagt ctctgacag cctttcacat gtgaaaggca 2820
ggtagagaaa tagtcattta tgcccttagt tggcttattg aaacagtagg gcagaagaa 2880
cattgcatac gcatttgtct gaagtgaaca gagggatgac tttagctct gtctttctt 2940
tgtccacaag gaattacctt gtgggcaaat tgtgaggag gtatgtagct ttttttctt 3000
tgtagctatc ttatttagga ataaaatggg aggcaggttt gcctgatgca attccagct 3060
tgactttccc ttttggttta gtgatttttg ggtcctgag gtttatttt tctttcacat 3120
tagtataact acttttctt ttctaattcc ttttctact gtatgtgta cagctgact 3180
atgttacttg caaaaaaat tctgactaat gcacatctg actagaaggc aggttcttc 3240
gatgataacg aatcctccag aatctagtaa acagaattgc ctgaaaaaga ggtgggtgtc 3300
ttcttgggga atttctcatg gcaatgaatg gcaactggc aaaggattta tgaccagact 3360
gagctctctt ttatctatc tgttactcac caagacctat tagggtttgt gctccacagg 3420
gacactggtt tctaagttct aggtttaaag agtccactcc caggccacc acaccatgcc 3480
ctcctgacac ctggtgaaca gcaataaaat tgtttcttat tctgaaaate ctccaatact 3540
tccaccatcc caaaaaatgc agtggaggag gagagaaaat gaattgttcc attagagaa 3600
acaatatcca ttatattatt cttggccttt gagatacctt acaaaacaaa taaaaaaaa 3660
gtcccaattt aacatcttt aataatcttt acaaaacaga acacatctcc tttctgttc 3720
atagtcaaga ggctcagtg caactgtggt gaaaagtgtc agattctggt catgtttcaa 3780
aagtagaaaa aatagaattt gttaacatat tggatgtgag gctgggaga aactgaaat 3840
caagggtggt gcaagtgtt aaactgagca actagagaat ttggaaggac atttctgag 3900
atggggaagg caggcgggaa tcagggatta gattgaaca tattagacat ttgagatgcc 3960
tgctagacct ctaattggca atatcccttg gacaggtgga tgaatatgct tgattctgga 4020
gttcgggaaa tagtccgggt ggagatgcaa atttgggaaa caggcggagg ttactagcaa 4080
tgagttaaat caatgaaggc aggtctgggac ctggcaggta acccaacaag tagaggtcga 4140
agagtagaga agaaaaacag acaggagact tagaagcagt ggtcaggagg aaggagtga 4200
accaagaaag tgatgtccca gagccaacaa aataaggatt tctttctgt ttacaaatgt 4260
aaaattaaaa ggtttaataa aaagaaaatt tacttttatg gttggttgtt attaatggt 4320
ccaaacactg tctcctattt gtgaatcag aactctctca tggcagtaga aaatttgga 4380
agttactttt taaaagggtg gtgcactgct gccctttgct ggtcaagtt atgcactgca 4440
aattccaagg acgattgctc gtcagctttt ctcttttaa atagctcagg ctgtacaagc 4500
tagaaagaac ctgcgaagat attccttcca acatttgcat ttgacttatg ggaagtgcag 4560
gttcagccag aaaagttgtg tgcaaggcgg ttatgtaaag tttatcagac ctgattctta 4620
cggctcttcc cattgtttcg agcctcctt ccattcact cccgctcata cgcgaccaag 4680
tataggacag gagtgttat tctgcacttt atagcagctc cactgtctgg cactctgatg 4740
ttctttaatt acaagcttta tgacagtgat tctcaacctg ctccactgcc tccacctagt 4800
ggcagaaaaa agaaaatgtg tgaactcgg gagtctctgg tctgaaagct ccggggtatc 4860
atttcttcaa agtcttgagc ttgtttttgt ttgtatttat ttatttattt gttttagaga 4920
caaggctctg cactgcactc cagcctggga gacagagcga gacaattcag gatctatcta 4980
gtgaataaag agatatacgt aatgactgtt ttatattgtg gctgtagcgc attcagaggga 5040
taattcgatt ctgttctgct ttccaatgca tggctcactg taacctccaa ctccggggt 5100
caagcgatcc tccactccca gcttctccag tagttgagct tgatttattt taaagtttca 5160
taaaattttg ccatttcttt ccacaatatg gccatgtgtg ctttactata aaatattttc 5220
atcacaaaaa ttacatcgct ggaaatcccc ataagccagt ttgagaaaca caaccaaga 5280
aagcagaaca gactcaaat atcccttaaa tcccccttaa ccacaaatat aaaacagtc 5340
gtgactgggc gtgttggtt acacctgtaa tcccagcact ttgggaggec aaggcgggtg 5400
gattacttga gctcaggagt tcaagaccag cctggccaac atggtgaaac cccgtcccta 5460
ttaaaaatac aaaattatcc aggagttgtg gcaggcagtt gtaatccag ctacttggga 5520

```

ggctgaggca	ggagaatcac	ttgaacccag	gaggtggagg	ttgtagttag	ccaagattgt	5580
gccagtgccac	tccagcctgg	gcaacagagc	gagacttcca	tcttaaaaaa	aaaaaattaa	5640
gtaataaaaa	tataaaaaaa	taaagcagtc	cctattgata	tctctttatt	cactaaatca	5700
acctggaatt	gacctgaatt	ctgatttttt	tttcatcatg	gatttttttg	attaattttg	5760
attgttttaa	tattgcatta	aaatattatt	tatcttgact	actgagtttg	cgggacctcc	5820
ttaaaattta	tgaccaaggc	aatgcctcac	tcactcgcc	taccataatc	tgggccacat	5880
atcaggggct	ccaatagcaa	gcaacatgac	ttttgaacag	ctaagacttc	tctcttcact	5940
gtgaagacca	gatgggcct	gcaaacagtg	taacctctac	atgaaaatgc	acgagattcc	6000
aactacaacc	aggcacaaaa	gactctgatg	gtgaagtccc	agccctccaa	gtcccaactt	6060
cctgaaggga	aagagcacc	caagttctga	ccagaggcca	gagtcataac	gaagatggaa	6120
tgtgagcttg	acatagaagg	ggtggtagca	cctggctcag	taatgaagag	gctttcggtc	6180
ctgaagggaag	agctcagcac	attcaaaagat	tagaaggag	gtcccagtc	taggagcagg	6240
gaaggagaga	aggcccaata	agaaacacag	acaggaggga	ggggtcagg	caagatcata	6300
ctggaaacac	ctagagagct	aataaaaagtc	acagtgcaca	gtcccacat	ggaccagact	6360
cttcgggaat	tctaggcatc	aattttggca	ccagtagttt	tcaaaagtct	ccagaagatt	6420
ctatgcacac	cagccaaagg	tgggaaccac	agggtgtggc	ctagggatca	tgacaatgag	6480
tttctaaagt	caataagaaa	cctccagaga	gtttaagcag	gggaataatt	tgatttggtt	6540
cttgtttgtg	atttttaaag	atcagtcctg	ttactgtgtg	taagacaata	atccagaaaa	6600
cctgttgctc	atgaaccaca	tatctgtaaa	tttgcttccc	ctgtaactgg	atctaaccac	6660
caaaaattag	tacttactaa	gaaattacat	gcccaggagc	tatgctaagt	aattcataaa	6720
cactatttta	tttactcctc	acagcaagtt	tataagagaa	acgttattat	ttccacattt	6780
cggatgagaa	atttgaggct	tggggaaagt	taagtaattt	acctaattgc	acacccagtt	6840
cgtcttgatg	agagttaaga	ttctaattct	gtgtctaagt	tgatgtcca	tcaaacacac	6900
cacgcctcca	actaggaagc	aacatgctgg	ccagaggatg	ctgtcatcaa	gtttacagaa	6960
tggtttagatt	tctaggcaca	gatgaataaa	tcaacatgtt	ggtttgcaat	agaatgaatc	7020
tatccagctc	tgaatttgca	tccaagggtt	tgtgagcaca	caagtctaaa	agtgtggcct	7080
cagctctgct	aacttcacac	agggtgaata	ctaggaggcc	acctctgag	accaccagat	7140
ggacagtcca	ccatctgttt	acagatggta	aagccacata	ccagctttgc	catctgatgt	7200
tctctattca	cattcaacat	ttatacaaga	aatagtcata	tggatccttt	tcaatagaca	7260
gtactgggga	aattgaattg	ccatatgcag	aagaatggaa	ctagacctct	atctctcacc	7320
aaatacaaaa	atttgcaaac	gacagattaa	agacttacat	ataagacctg	taactacaaa	7380
aacactagaa	gaaaacctag	ggaaaatgct	tctggaatta	atctaggtga	agaactcagg	7440
actaagatat	caaaagcaca	agcaccacaa	caaaaataga	caaacaggac	ttaattaaac	7500
tagaacgctt	ctgaacagca	agagaaataa	tcaatagagt	gaacagataa	tctgcagaa	7560
gggtgaaaat	atttgcaaac	tatgcaccc	acagggaat	aatgtccaga	atttagaagg	7620
aactcaaaaa	attcaacaac	aacagcaaaa	taacccacc	aaaaaagtgg	gcaaaggaca	7680
tgaatagaca	tttttcaaaa	gaagggtat	gatattggtt	ggctctgtgt	ctccaccacg	7740
atctcacctt	aaattgtaat	aatccccaca	tatcatggga	gagaaccggg	gggaggtaat	7800
tgaatcatgg	gggcaggttt	gtcccagct	gtctcatgga	tactgaataa	gtccatagag	7860
atctgatgat	tttataaagg	ggagttcccc	tgcacacact	ctcttgccct	cctccatgta	7920
atatgtgcct	ttgcttctcc	tttgccctct	gcoatgattg	tgaggccctc	ccagcccatat	7980
ggaactgagt	caattaaacc	actttttctt	tgtaaattac	ccaatcttgg	gtatgtcttt	8040
attagcagca	taagaacaga	ctaatacagt	gtacaaatgg	ccaagaagcg	tacaaaaaac	8100
aaaatgctca	aataccta	cactagagaa	tgcgaagtta	aaaccacaa	gagatattat	8160
cttacagcag	tcagaatgcc	tattattaaa	acacacaaaa	ataacatgtt	ggcaaggatg	8220
cagagaaaa	ggaatactta	cacattatta	gtgggaatgt	aaactagtac	agcttctgtg	8280
gaaaacacta	tggagatttc	tcaaagaact	agaaatagaa	ctaccatgtg	gttcagcaat	8340
accacaactg	ggtatctacc	caaaggga	ttaaattatta	tataaaaaag	atatctgcac	8400
tcacttggtt	attgcagcac	tattcacaa	agcaaaagata	tggaaatcaac	ccaagtgtcc	8460
atcaacagat	gatttgataa	agaaaaacgtg	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtat	8520
acacatacca	caatgaaata	ctattcagct	ataaagaaaa	gaatgaaatc	atgtcttttg	8580
cagcaatgtg	gttggaaactg	gagggcatta	tcttaagtgg	ataattcaaa	aacagaagg	8640
caaattgtcac	atgttctcac	ttataagtgg	gagctaaatg	atgtgtacac	atggacatag	8700
agtgtggtat	gataaacact	ggagattgag	atgggtggaa	gggtggaaag	aggttgagtg	8760
atgagaaaa	actaaatgga	tacaatatag	atgattcagg	cgatagatac	actaaaagcc	8820
cagacttcac	cactacacag	tatagctatg	tagcaaaatt	gcacctgtat	tgcttaatt	8880
tatacaagta	aaaaaaagat	cgtacgaatt	ctgtttttta	ttctctatga	aattactact	8940
gagagtatta	tccaatgccg	tttctatgca	gtgcccccaa	tatttatccat	ttagcagctc	9000
ctatgcaatg	ccccaaagata	gaaattgtct	tcaactttta	tcccaggaaa	accttcagtc	9060
acacgtagaa	actagaaatt	tttcccctag	atgaaagtta	tgtaacataa	cacattatct	9120
tcatttagtc	ggtttccaag	aagctcagaa	ccagatttta	tgttcaatca	aaaactgctt	9180

```

atTTtaagtg aggtttactg aggtataaat tacaataaaa gccacctttt cgtgtatatt 9240
tctataagtt ttggcaaatg catagctgtg taaccacaac cacattcaag atataggaca 9300
agtcacctcat ccttttaagt tcttttatgc ccttccttc accccagccc ttggcaacca 9360
ctggtttttg tctgatccaa tctgttgctt ctctctgaat gtcatgtaaa tagagccatg 9420
caatgtgaag ccttttgagt ctggctttgt tcacttggtc acttaggaga atgcatttga 9480
gattcatctt tctgttttct tctagcacta gttcactgtc tatgtttgag tagtattcca 9540
ttgtgtggat atgccacaga ttgtttatct agttaacaat ttaaagccat ttggtcattt 9600
ctaattttta gctgctaaga ataaagtgtc tctaagcttt ccaatgcagg tttttgtgtg 9660
aactcaggat ttcatttcgc ttgggtaaat tcttagcttt gggactgctg agtcattctg 9720
taggtgtatg ttgaacttta taagaaactg ccaaactgtt ttccaaagt gctgtgctct 9780
tttgactctc catcagcagt gaatgagggt tccacttgct cgagcctagt attttaactt 9840
cactatatac ctctttgat gacatatcct ttcaaatttt tggccaagt tttattggg 9900
tgttgttact atggactgtg agagttcttt gtatatctg catatgattt tttctcaca 9960
tttgtgtttt ttgaacttta taagaaactg tctggcgctt ttattttct taacgtgcca 10020
tgtgaagagc agaagtttaa ttttatgatg tccaaattat cttttttct tttcttttt 10080
agatcaaaat aggggtctat ttgtattacc actgttattt tatctccatt tgattttcga 10140
tttttatttt ttttttcta atttcattgt aaatttttaa ttaaacccaa atattctagg 10200
ggaaagaggg aagataaaaa tagtctaact tgggcataaa ttttagagtc atattctctt 10260
gccgagaaag gaaactagct ctcttaccat gattgtttaa tttcagagct cactacttta 10320
tgaggatgcc caaattatgg gctttaaaaa atatatatcc aaacaggggt tcagaaagaa 10380
taactaattt gtccacaaca acacaaaaaa tgattccacc ataagtttgc ccagtgcag 10440
ggcttatatt attttctata tatcaaatc tacaactggt tcttaaagct actgtacata 10500
acctgaagtta aaatatagg tattagtga taagacattt tatcatctat gaaatgttgc 10560
ctgttgtcat agttagagaa tcttttaaaa tatggagcta tttctataga ttaaactatg 10620
ccagttaaaa gttgggtaaa aagaactaca gaataatatt tatgtttatc gtgtaagggt 10680
ttaaagcaaa ctccaagtc ttttcatcaa tgaaatcaat aaggttttgc aaatatata 10740
gtatgaaaaa actgatttaa aatgcaata aggggagagt ttgagagaga gagagagacc 10800
aaatgatttt ataattctag taagtttata ggtttatggg gtttttacgt acttttctac 10860
ccaactgtgc tataagactt taatgaatca cttagaattt ttaaaataat ttattattac 10920
tctgtacctg ttttttactc tgcaaatctt acctgacctt ttgtctaaa agcaataaaa 10980
tctgacctg ttatatctgt atcatctgt ttgttactta gcaagcacag tgatccatta 11040
ggcctatgta ggctcatggt ttatacaaca ctgccatctg ctgacagagt gtgacagtca 11100
cagtcagcaa cagcagacca ctttattttc attttttagt tttatagaaa tatgaatata 11160
cacaatatgt ataattgaac ctaagcttca caaattaaca ttttgctaatt ctgttttcaa 11220
ctaccgcctc cccctctatc caattactct gttctctcac ctctccacac acagacactg 11280
gcagtatttt tcagccaatc attaatacgt tgccaactga taaggacttt taaaaaaca 11340
ccaccattcc atttatgatt ccagcataat tgagagtaat tccctaatat ccaataacca 11400
ttttcttact caatttctct gattgtcttt aaactgtttt taccctaagt ttgcttaaat 11460
caaagctcag tctctgttaa acatatggtt aagttttacc caaaccacaa taaataata 11520
aataaataaa taaataacct attttttcca attccagggg atagtgaag agggtaaatg 11580
ccattattta gaaacataaa tcacatcata ggactagaat tatcttgaa tcaaaattga 11640
agactgaaaa tggaaaagaa aggtatagac taaacttatt taaaaactc aatgcagaac 11700
tctaagagaa gatattagaa agttgtacca gcattcatta ttcagtattc atcagtattc 11760
actcagctat atgtagtga aatctaacta gaggagcttg atcagataaa gagatacatt 11820
tttctacca aggcggactc tggaggcagg tggttcagag ctgacagct gctgcaggac 11880
ccaggtcctt tccctgctg ctctccact ctagcttggt actttcatcc tgcaagatgg 11940
gtgtttctgc caagttccag atagaagaag atagaacaca aaggagaaat aagcagtggt 12000
gctctgtgct atcaagcaaa atttttccag aaatgcacaa tagatttcag atgatgtctc 12060
aacagtccta actgcaagaa agctgaggaa ttgatTTTT ggctgggaca ctgttgccct 12120
gtaaaaaaat tgggattctg ttattaaaga ataagaggag ggaagaaaga ttgaaaaactc 12180
ctatgcaata gtgaaaaaaa taagaaactc aataaaaaag tgggcatacc ttaaaaaacag 12240
gcaattcaca acagatgaga ccccaatagc caataaacat ttttaaatgg tcaacctcat 12300
gagtgatcag aaaacacaaa tatgtatttt aaacaaaaaa taaaatacaa tgtattgacc 12360
atttgagtgg aaaaaatta aaaagcctga taatatcaag tattggagag gatgtagagt 12420
gaggaaacct catggaggac ctatcattgc aaatgtggga atgaaactta atacacgaat 12480
ttgaggccaa ttgttaaat gaaaaatgag cacaccctgc aaccaagtac cccttgcaat 12540
atTTttgaaa agacaaaaac gttatgtaaa tggaaatcat caatatgtga cctttatact 12600
cagcataatg cccctcagat ccattgaagt catgtgtatc aacagctcac ttttttttt 12660
ttaatttttt tttagagacag agtctcactc tgtcacacag ggtggagtgc agtggcgaga 12720
tcataactct ctctagcagc ctgaaactcc tgggctcaag catctctctg cctcagcctc 12780
ccaagtagct aggactacag gcatgggaca caacacacag ctaatttttt taaatttttt 12840

```

ttagagacat	ggctcacta	tgttgccctac	gctgggtctca	aactcctag	tcaagcgatt	12900
ctcccacctc	tacttcacaa	agtgcgttag	gtatgtaggt	atggattgta	ggtatgaacc	12960
accgtgcccc	actcactact	ttttattact	aattattcca	tgggatggat	gtaccgcagt	13020
ttgttttacc	attaatctat	tgtaggacat	tttgactgat	tccagttttt	ttttaataca	13080
aataaaacca	ctatgaatag	ttgtgtattg	tatacgtttt	tgtgctaagt	tttcattttt	13140
ctgggataag	ttttcatctc	tttgggcttt	tactgtatcc	ttgatattat	aatatggtac	13200
atcttcagtt	ttattctatt	caatatataa	tcctttattt	tccttgaaat	ctcccatgga	13260
ttgttttagaa	gtgtgttgtt	ttgtttccaa	gggtttggca	tttttcccat	tatttttcta	13320
ttatcgattt	ccagtttgat	tccaggtggg	cagagaacac	acttcagtgt	atttcagttc	13380
tattaaatct	gttgagggtt	gttacatggc	ccagtatatg	gcaatttttg	tatatgttcc	13440
atgagcactt	gaaaagaatg	cgaattctgc	tgggtgctgg	tggagttttc	cagcaatgtt	13500
gattttatgat	cttactcatt	gatgggtggg	ttgagtttga	tgtgttctta	cgatggcagc	13560
tttaacattc	ttgtcaggta	attctaacgt	ctctgtcatg	tcagtattag	cgcctcttaa	13620
ctgtctctac	aaagctgaga	ttttcctggg	tcctcctggg	cctgttgagg	tgtgtggttc	13680
tcattttgaaa	tctggacttt	ggagtattgt	gttatgaggc	tttggatctc	atttaaacctc	13740
atctcagcga	atttcctctc	ttgccactca	ggaaggagaa	gttgggtgtt	tgaatggagc	13800
agagccgtta	ctgccttāga	attgtttttac	tgggcttccc	ctttctttct	cctttgacta	13860
gagagagcca	gctttttatt	agggctttat	gtttttctgg	gcctgttggt	gtttctgggt	13920
tgacaaactt	ctccagaacc	aagtctggaa	tggatgaggc	aaaaagaaac	ccctgtggaat	13980
gcactgctgg	gtcgtctcct	gggtcccaat	gttcctaact	ggctctgcctt	cttctctcca	14040
gcttccagag	tcttcataag	tttgctttac	gtacaatgtc	cggggttttt	actttacttg	14100
agagaaatag	gtaaaagtaa	ttctactcca	tctttcagga	agcaaaagcc	cccttgtgta	14160
tttttttaaa	ctttcaaaaa	caaaacaaea	ggcagctgca	acagtaaaag	agctagttaac	14220
acccttggtg	ggaaattcaa	gtccaaatac	acatttttaag	tttggctagc	cagtgagaac	14280
atcagaatag	tccaggtttt	aaacaaattt	atattttatga	ttatgcatat	actaaaagct	14340
gaaggcatct	tatatattact	aagcacctat	tttgttcttg	ttaaaaagac	agaattccat	14400
tccctagagc	atttgacctg	gcagctggag	ctgatccacc	tggccactag	agcacagagc	14460
agggagagta	gtagccctgc	cccagccacc	cctcaagaca	ggattctttc	tctgggaact	14520
gtaggttaaca	ctaaatcggt	ctggaacaca	acaacgaaag	aagaaaggaa	agagaaagaa	14580
agaaagggaag	aaagagagag	agaagggaag	aagggaaggga	gggaagggaag	gaagggaag	14640
ggaagggaag	ggaagggaag	gaagggaagga	aaagggaaggga	aggggaaggga	agagggaaggga	14700
aggaaggaaa	ggaagggaag	gaagggaagaa	ggaagggaaaa	aaagaaagaa	agaagaaaga	14760
aagaaagaca	agaaaggaag	aaagaaagaa	agaaaggggga	aagaaagaa	agaggaaaga	14820
aaagaaagaa	aagaaagaa	agaaaggaaa	gaaaggagaa	gaaagaaaaa	gaaagagaaa	14880
gaaagagaaa	gaaagagaaa	gaaagagaaa	gaaagagaaa	gaaagagaaa	gaaagagaaa	14940
aaagaaagag	aaagaaagaa	aaagaaagaa	agaaagaaag	aaagaaagaa	aaagaaagaa	15000
aaagaaagaa	agaaagaaag	aaagaaagaa	aaagaaagaa	gagaaaatga	cagcaattac	15060
ttttgcaaca	acctaataata	agttttttta	aagttaaata	ttctgttcca	tgcattgctg	15120
gataccttat	aaataacagg	gcatacctatg	acctgaattt	cccaaattat	gagttgaggg	15180
tttgaactag	ttttaaaaaa	caaggaggcc	aggcgactg	gctcatgcct	gtaatcccag	15240
cacttttgga	ggctgaggca	ggtggatcac	gaggtcagga	gctcgagacc	agccttacca	15300
acatagtga	acaccgcctc	tactaaaaat	acaaaaatta	gcggggcgtg	atggtgcgca	15360
cctgtaactc	cagctactca	gcaggctgag	gcaggagaat	cgcttgaacc	cagaaggcgg	15420
aggttgagct	gagccaagat	cacagcattg	cactccagcc	tgggcgacag	agggagactc	15480
cgctcttcaaa	aaaaaaaaaa	aagacaaggga	atctgtaaaa	caggcactgg	aagtatatgc	15540
acttttattt	tcattctatg	ctatccgatg	cctactgcta	tttcccttca	tatttaacct	15600
ccaacccctg	catcttgctc	cctccagacc	acctgattgg	agctcacgtg	ctcccacaca	15660
gtacctccga	ccagagagag	tcgagtccca	cagaaaggcg	taaccaatcac	cagtaatttt	15720
gcacttatct	tacattgtgc	cttgatacag	agtaactaat	gaatgctctt	tgaatcatat	15780
tttaataaata	tgtgtatttg	ggattgtagc	atattgcagc	tacctggata	tataatttaa	15840
ttagaaaaaa	aatttttgtg	ggctcaatca	acaaacgact	ttctctctc	tctctttctc	15900
ttctctccct	tctctctctt	tctctcagt	tgatgttgct	ggagttcagt	gttgtgcaga	15960
tggcagtgac	aatgccaatg	ggcacatgag	atatgataaa	aggtccctga	agaagggtga	16020
gaaccagtta	tcttatgaaa	ttttccagag	tgggtactgg	atctctctct	tctggcacca	16080
tgtggtgctc	agcccaaggg	gaatttcctt	ccagagacag	agggcagtg	ttgaggtggg	16140
gagacagatc	gtaacactga	gacttacatg	aggacaccaa	acagaaaaaa	ggtgggcaagt	16200
atagaaaaatt	ctttctctctg	gacagctctc	tctgttctaa	cttcagcaaa	attctccccc	16260
cagtgatgac	tattgcacaa	ccctacatat	gctatgtttt	ttcctatata	cacttaccta	16320
tgataaaatg	catttaattag	tcacagtaag	aggttaacaa	caataactag	taataaaata	16380
gaacaattca	gtaaaaaag	agttacttga	gcacaaacac	taggatata	tgacagtcaa	16440
tctgatgacc	aagagggtca	ctaagcatct	aaacaggagg	gtaagtgtag	acagcatgga	16500

```

gagcgtggac aaagggatga ttcagtccca ggctgggtat gagcgggaag gcatgatatg 16560
tcatcacgct actaaggcac acaattttaa atgagtaaat tcttatttct agaaatttct 16620
ttttaatat ttccagactac agttgcctac aggttaactga aaccccagaa agcaaaattg 16680
ttgataagga ggtactactg tacatcgtcc tttgaaccac ctttatcatt tgctagtata 16740
tacatatata cctacataca tacatatata catacctgca cacacctata tgtatacgta 16800
cacacacaca cagcacaca cacacactca catctactaa tgttagaata agtttgctaa 16860
ataagatgca caacttgta atgtcctaca gagcaataaa accataagca ttgggggtat 16920
cttttctact agataaaaat ccattatcat ttccataaag ttttctttac attaacatct 16980
aacttttgca atctagtgtt taatcatcat aaataggaag caaatgaact gtttctctag 17040
tgaatcaaat atccttgaaa acatacatag tcatcttttt gggttatttt tatttttaga 17100
taaattattt aaagttttaa ataatttaac attcacaata gtttgtgact gtatatlttg 17160
acttggtcct tcaaaactaa ttgtacttt tatgtatcgt gcttacctca attttttatt 17220
cacttttctt aaactttgct ggattggttt attatttttt tctatttctt ttccttctag 17280
tgggtttgaa ggggtttttt aatcccatca ctattgaatg cctattaact tgccccctt 17340
ttctttcagt ctctattccc acggcctgaa gcatgagggc caagctgtct gtaaccagca 17400
gagagatgac ccaggtgtta ttccactctc cactgtccac ctatcaccat tcccagcccg 17460
atagctctga agtacggctt ttctggggct ctgtggggaa aactagaact ggctgcttca 17520
aggacacctc ctgtttttgc aatggaaaaa atgtttctaa attccagttt ctctatgaat 17580
tcaatgacat gggtttaaate tctgtgtgtt tcttcaaagt ttttcttctt aataggacct 17640
ctcatgattc tccaaccacg aaataaattc attatcattt ttatatctt tctgtcattg 17700
caaaggaggt tttgaaagag tggaggacgc gctaataaac tcaaaaatcc acactattcc 17760
ttgtttccat ctggtgttca ttcatgttt ccattggcct gtcgcctcc tatcctcctt 17820
cttagacttg gactgtctag ctacgccagg atagggaata gagagatcag actgttactt 17880
tgtctatgta gaaaaggaag acataagaaa ctccattttg atctgtatcc tgaacaattg 17940
ttttgccttg agatgctgtt aatctgtaac tttagcccca accctgtgct cacagaaaca 18000
tgtgtgttat ggaatcaaga ttttaaggat ctagggtgtg gcagaatgtg ccttgtaaac 18060
aacatgttta caggcagtat gcttggtaaa agtcatcgcc attctccatt ctcgattaac 18120
taggggcaca gtgcactgag gaaagccgca gggacctctg cccaggaaaa ctgggtattg 18180
tccaagggtt cccccactg agacagcctg agatatggcc ttgcgggatg ggaagatct 18240
gaccgtcccc cagcctgaca cccgtgaagg gtctgcgtg aggaggatta gtaaaagagg 18300
aaggcctctt gcggttgaga taagaggaa cctctgtct cctgcatgcc cctgggaacg 18360
gcatgtctca gtgtaaaacc tgattgtaca ttctgtctat tctgagatag gagaaaaccg 18420
ctctgtggct ggaggcgaga tatgctggcg gcaatgctgc tctgttgttc tttactacac 18480
tgagatgttt ggggtgagaga aicataaate tggcctacgt gcacatccag gcatagtacc 18540
ttcccttgaa ttacttgtg acacagattc ctttgtctac atgttttctt gctgaccttc 18600
tccccactat caccctgttc tctgtccgca ttccccctgc tgaggtagtg aaaatagtaa 18660
tcaataaata ctgagggaac tcagagaccg gtgccagcgc gggctcctcc tatgtcagat 18720
gacggctccc tgggcccact gtctcttctc tatactttgt ctctgtgtct tatttctttt 18780
ctcagctctc ctgcccact gacgagaaat acccacaggt ttggaggggc ttgacacccc 18840
ttcgagccag gattatcagg gcatttgagg gtctgcaaaa ctaagcccca actcatcgat 18900
ttcacaactt catccagagc cagcctgaac agtagttgcc catgatttct atgccttaat 18960
acgagaagag aacatagggg ctgggtgcc aataggtaga cagggagggc agggaaactct 19020
aagacagagc ttgaggggct cattctctt gcaaaatgaa acaaaaacca cagcactgaa 19080
tatgtaaatc tcgggtggctg aacccctctt aggatagtaa gccctgacac aattgctgct 19140
atcttctctt tctctcaagg aagtcaaaaa acacctgcag ccttactgtc ccttggaata 19200
caagatgaac atctacattt tctaaagtgg gacaagaatc tctgttcata tttatgtccc 19260
atgcatttgc acgtggcggg acaaaggact ttgcttctgc cagcacatct gtcttcagat 19320
atgagaggaa acagacacaa cctggagcgc gcaaagaagc agctcttctt caagtgaact 19380
cctctatctc cctacttctt ggctaattgg gcagccttga tccttgggaa tccaggacag 19440
atatccactc gtgacaaact agctggaaga atgacaacca atcaggttcc aagcaccact 19500
ggatgtgaac cacagaattt cctcctctcc ttgtggaatg tcagcttaag tctgacaaa 19560
aatgtaaaac tgagagagtt acaatcttaa ggaggagtca agctaaagca gaaagaatca 19620
cctactctgg actccagcat gactgctgag ctcaaataa tatagagaga gaaagaacca 19680
caaacttgaa gatggatct agctacagac ttctctgagt caggtaggga aatggccatc 19740
cctcaaacct tgcaaaaggc aaacttatgc catttgttcc tctgacatac tgggtgatgt 19800
actgtatgtt actgatgtga ggggaacttc ctaaaattgg tagtaaatca tgccaaataa 19860
aaagcaaaaa tgatatltct tgaaatgtta catctgagga acattgctaa aataatttat 19920
cagtagtttt caggatgatt tatagatgtg cattgaagtg tgtacttgtg ctctctctct 19980
cctctctctc tctcttctc tctctctct cgtctttct ctcttgcct cctcctctc 20040
ctgactttcc tctctgtccc ctccacagca gtttatattt ttttctgat aatctaactt 20100
tgctgagggg tcaatgtaaa gcacctcag tgatgagtta gttggaatgt tcccaagaa 20160

```

```

attctatttc cagcactctt ttacatgaaa tccaagaagc tctcagacta tcttactgac 20220
accttgccct tctcaacag atcaatctta tcaatgtcca tcacagatat tttgtagaac 20280
gggtggatcct ggcagagtct cacagatgct tctgagacaa catttgcttt caaaaaatga 20340
accacacaca tcctaaagat ctcagccact tcccatgttt cttttgtgt tacagcaaac 20400
atcacacaac tcattcctac agatcaccac tgcattgtgat caataaaata gtttttgcaa 20460
caatggtagt tatgataatc atcttttatt gtttacaaat actgctttac aatagttatt 20520
cggttgcact gttcatatta gatttccaat tagctcactt aggaacataa gtccctcgaa 20580
cagctcagtc atctttttca ttctgttttc tatccctac atctctttcc tttgcagacg 20640
actatctcct acactgaaac aggaaagctt ttaccttttt gccatgcttg atttaaagat 20700
tatagaaaag tatttgacaa agaaaactca cacatgtgtg tacatatctt ttaaaaagtt 20760
atgttttatgc attgcacagg aatatcgaga atgctaatag gcaatgtcag agtttactgt 20820
ttttcaaat tagtacagt ttattatttc taaaaactat aaaatgaata tattcacatc 20880
accatacaga agagtaggag gagatggcat aaagtgtcat tgttcctcct ctgcaatccc 20940
aggagataac taccaagcac aatttatgtc ttttaaaatt cagcccgtat ttatatacat 21000
atatattcaa ttagatggg atcatgatat ctcaccacac atactcttca gtgacctgca 21060
ttttcacaaa cactttccac gtaactatat agaagtctac gtcttcccct taatgtctgc 21120
tttgtgtac attgtaaagc tctagcacag ttttaaccaa ctctatttaa tgaggatttt 21180
agttattttt cactctttta acaatatttc catgtgtagt cttatacata cgtctgtaca 21240
cacttatccc agtctaagga gttcctttta ccttcccca tcccagcatt cctgtcacg 21300
ctttgtgctt ccgttgagt actttactcc tggagtataa tctgcgtata gttcagttaa 21360
aaacatggga tctgagttta ggtcacagct ctgccactta ctgccataag ccaagttcctt 21420
gacctctctg cctcaagtt tttgcaccta caaagtaggg gataatatta gttcctagtt 21480
catagagtct tgggaataat taaatgtgat gatccatgta caatgtctg cacttagtaa 21540
gtgtccta aatgtcaccc tttatgattg gtattgcgtg tatgtctgca gagaaaatca 21600
ctttgtgtcc cctttaaaaa aggactatgc ccttggtcag ctattttgca cattaaattt 21660
cacttgccaa tattaactct ccacctctaa cttgatccct ctcttctctc atcttctggt 21720
gagaccaaat gctaattctg ctattcaagg caactagcaa agctgccagt gacagaatca 21780
aataaaccta cccctaactt ttagaattgt agttatgatt tctgttgtaa aagttactgt 21840
tgtggcagtc agtattagtc tttggtctat gatagcatct ctgactctatt attgaytttc 21900
aattakgat ttttttttat ttattctgaa aatgtttgtt aagcatttgc taagtaaaaga 21960
tactggackg agcctcccaa atacagggca aataaaacat caaacagctt ataatttaga 22020
agggtagaag agaactctgaa agcaggtaaa aataaacagg cactcggctg gccgaggtag 22080
ctcacgctg taatcccagc actttgggag gccgaggtag gccgagtcag aggtcaggag 22140
atcgagacca tcctggctaa cacggtgaaa ccccgctctc actaaaaata caaaaaatta 22200
gcgaggcgtg gtggcgggag cctttagtc cagctagtcg ggaggctgag gcaggagaat 22260
gggtgtgaacc cgggaggcgg agcttgcaat gagccaagat cgcaccactg cactccagcc 22320
tggygacag agcgagactc cgtctcaaaa aaaataaata aataaaataa aaaataatta 22380
ggtactctag gccagtgac ctgtctctgt actctgtaaa ttcaggtcac ctgctcaggg 22440
ctaactctgag agaaggctc tcttcagttg aattttgaaa gacaattagc agttcacaaag 22500
ctaaccaggg tggacaaaga ttttccaaag cagaggaggt gcttgtgaaa gctggaggcc 22560
atagaaaaac tctaaggagt gtaggagggt gggagtaatg tatggaaggg gtggagatgg 22620
aagggttaaga gagatacaag gctgcaaaaa tggagctgga ctcaaaaaga aatactgaaa 22680
aggctctcag tgtgttgat gagattacta tggaaacact atggaacact gggactccat 22740
ggcagctcca aagatggcat ggcctggctc cagctcagta agagctgagc tcttctgtg 22800

```

<210> 101

<211> 154

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 101

```

tctggcaaca cggcctccct gaccgtctct gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
tactgcagct catatgcagg cagcaacaat ttaagtcttc ggaactggga ccaagggtcac 120
cgtctaggt cagcccaagt ccaactccac tctc

```

154

<210> 102

<211> 156

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 102

```
tcagggaaca tggccacctt gactatcagt ggggccagg tggaggatga agctgactac 60
tactgttact caacagacag cagtggtaat cattatgtct tcggaactgg gaccaaggtc 120
accgtcctag gtcagcccaa gtccactccc actctc 156
```

<210> 103

<211> 150

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 103

```
tctgggaaca cagccactct gaccatcagc gggacccagg ctatggatga ggctgactat 60
tactgtcagg cgtgggacag cagcactgcc gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc 120
ctaggtcagc ccaagtccac tccactctc 150
```

<210> 104

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 104

aggtggaaac acggtgagag t

21

<210> 105

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 105

ccactcgggg aaaagttgga a

21

Lisboa, 2016-06-03

REIVINDICAÇÕES

1. Ratinho compreendendo:

um segmento génico de região variável de cadeia leve λ de imunoglobulina humana ($hV\lambda$) não rearranjado e um segmento génico de junção λ humano ($hJ\lambda$) que estão ligados funcionalmente a um segmento génico de região constante de cadeia leve kappa ($C\kappa$) de imunoglobulina de ratinho ao nível de um locus κ endógeno de cadeia leve de imunoglobulina de ratinho, em que, ao nível do referido locus, o elemento amplificador intrónico κ a montante do gene $C\kappa$ (designado por $E\kappa i$) e o amplificador $3'\kappa$ a jusante do gene $C\kappa$ (designado por $E\kappa 3'$) são mantidos, onde o ratinho expressa um anticorpo compreendendo uma cadeia leve que contém uma sequência $V\lambda$ - $J\lambda$ humana rearranjada e uma sequência $C\kappa$ de ratinho.

2. Ratinho de acordo com a reivindicação 1, em que o ratinho é desprovido ou praticamente desprovido de um segmento génico $V\kappa$ de ratinho funcional e é desprovido ou praticamente desprovido de um segmento génico $J\kappa$ de ratinho funcional.

3. Ratinho de acordo com a reivindicação 1, compreendendo uma pluralidade de segmentos génicos $hV\lambda$ não rearranjados.

4. Ratinho de acordo com a reivindicação 3, em que a pluralidade de segmentos génicos $hV\lambda$ não rearranjados compreende:

(a) pelo menos 12 segmentos génicos $hV\lambda$; ou

(b) 13 a 28 ou mais segmentos génicos $hV\lambda$.

5. Ratinho de acordo com a reivindicação 4, em que os segmentos génicos $hV\lambda$ incluem 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11 e 3-12.

6. Ratinho de acordo com a reivindicação 4, em que os segmentos génicos $hV\lambda$ incluem 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25 e 3-27.

7. Ratinho de acordo com a reivindicação 1, em que o segmento génico J λ humano é o segmento J λ 1 humano.

8. Ratinho de acordo com a reivindicação 1, em que o ratinho compreende quatro segmentos génicos J λ humanos, preferencialmente em que os quatro segmentos génicos J λ humanos são J λ 1, J λ 2, J λ 3 e J λ 7.

9. Ratinho de acordo com a reivindicação 1, em que o locus λ de cadeia leve de ratinho é eliminado na totalidade ou em parte.

10. Ratinho de acordo com a reivindicação 1, em que o locus κ endógeno de cadeia leve de ratinho compreende:

(a) uma sequência contígua do locus λ de cadeia leve humano que vai de hV λ 3-12 a hV λ 3-1;

(b) uma sequência contígua do locus λ de cadeia leve humano que vai de hV λ 3-27 a hV λ 3-1; ou

(c) uma sequência contígua do locus λ de cadeia leve humano que vai de hV λ 5-52 a hV λ 1-40 e uma sequência contígua do locus λ de cadeia leve humano que vai de hV λ 3-29 a hV λ 3-1.

11. Célula isolada que expressa um anticorpo compreendendo uma cadeia leve que contém uma sequência V λ -J λ humana rearranjada e uma sequência C κ de ratinho, em que a célula provém, ou pode ser obtida, do ratinho de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, e em que a célula compreende um hV λ e um hJ λ que estão ligados funcionalmente a um segmento génico C κ de ratinho ao nível de um locus κ endógeno de cadeia leve de imunoglobulina de ratinho, em que, ao nível do referido locus, o elemento amplificador intrónico κ a montante do gene C κ (designado por E κ i) e o amplificador 3' κ a jusante do gene C κ (designado por E κ 3') são mantidos.

12. Célula isolada de acordo com a reivindicação 11, em que a célula é uma célula B.

13. Célula-tronco embrionária (CTE) de ratinho isolada compreendendo um segmento génico de região variável de cadeia

leve λ de imunoglobulina humana ($hV\lambda$) não rearranjado e um segmento génico de junção λ humano ($hJ\lambda$) que estão ligados funcionalmente a um segmento génico C κ de ratinho ao nível de um locus κ endógeno de cadeia leve de imunoglobulina de ratinho, em que, ao nível do referido locus, o elemento amplificador intrónico κ a montante do gene C κ (designado por Ek1) e o amplificador 3' κ a jusante do gene C κ (designado por Ek3') são mantidos.

14. Embrião de ratinho compreendendo, produzido a partir, ou que pode ser obtido a partir, da célula CTE de ratinho de acordo com a reivindicação 13, em que o embrião de ratinho compreende um segmento génico de região variável de cadeia leve λ de imunoglobulina humana ($hV\lambda$) não rearranjado e um segmento génico de junção λ humano ($hJ\lambda$) que estão ligados funcionalmente a um segmento génico C κ de ratinho ao nível de um locus κ endógeno de cadeia leve de imunoglobulina de ratinho, em que, ao nível do referido locus, o elemento amplificador intrónico κ a montante do gene C κ (designado por Ek1) e o amplificador 3' κ a jusante do gene C κ (designado por Ek3') são mantidos.

15. Hibridoma compreendendo uma sequência génica de cadeia leve de imunoglobulina rearranjada derivada do ratinho de acordo com a reivindicação 1, em que a sequência rearranjada compreende um segmento génico $hV\lambda$, um segmento génico $hJ\lambda$ ligados funcionalmente a um segmento génico C κ de ratinho ao nível de um locus κ endógeno de cadeia leve de imunoglobulina de ratinho, em que, ao nível do referido locus, o elemento amplificador intrónico κ a montante do gene C κ (designado por Ek1) e o amplificador 3' κ a jusante do gene C κ (designado por Ek3') são mantidos, e onde o hibridoma expressa um anticorpo compreendendo uma cadeia leve que contém uma sequência $V\lambda$ - $J\lambda$ humana rearranjada e uma sequência C κ de ratinho.

16. Utilização da célula B de acordo com a reivindicação 12 para produzir um hibridoma compreendendo uma sequência génica de cadeia leve de imunoglobulina rearranjada derivada do ratinho de acordo com a reivindicação 1, em que a sequência rearranjada compreende um segmento génico $hV\lambda$, um segmento génico $hJ\lambda$ ligados funcionalmente a um segmento génico C κ de ratinho ao nível de um locus κ endógeno de cadeia leve de

imunoglobulina de ratinho, em que, ao nível do referido locus, o elemento amplificador intrónico κ a montante do gene C κ (designado por E κ i) e o amplificador 3' κ a jusante do gene C κ (designado por E κ 3') são mantidos, e onde o hibridoma expressa um anticorpo compreendendo uma cadeia leve que contém uma sequência V λ -J λ humana rearranjada e uma sequência C κ de ratinho.

17. Ratinho compreendendo:

(a) 12 a 40 segmentos génicos de região variável de cadeia leve λ de imunoglobulina humana (hV λ) não rearranjados e pelo menos um segmento génico J λ humano (hJ λ) que estão ligados funcionalmente a um gene C κ de ratinho ao nível de um locus κ endógeno de cadeia leve de imunoglobulina de ratinho, em que, ao nível do referido locus, o elemento amplificador intrónico κ a montante do gene C κ (designado por E κ i) e o amplificador 3' κ a jusante do gene C κ (designado por E κ 3') são mantidos; e

(b) uma sequência de ácidos nucleicos intergénica V κ -J κ humana localizada entre os 12 a 40 segmentos génicos de região variável de cadeia leve de imunoglobulina humana e a pelo menos uma sequência de ácidos nucleicos J λ humana;

em que o ratinho expressa um anticorpo que compreende uma cadeia leve contendo uma sequência V λ -J λ humana rearranjada e uma sequência C κ de ratinho.

18. Ratinho de acordo com a reivindicação 1, em que o ratinho compreende:

(a) 12 segmentos génicos V λ humanos; ou

(b) 28 ou mais segmentos génicos V λ humanos.

19. Método para produzir um anticorpo num ratinho, em que o método compreende:

(a) expor um ratinho de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 ou 17 a um antígeno;

(b) permitir que o ratinho desenvolva uma resposta imune ao antigénio; e

(c) isolar a partir do ratinho de (b) um anticorpo que reconhece especificamente o antigénio, ou isolar a partir do ratinho de (b) uma célula compreendendo um domínio de imunoglobulina que reconhece especificamente o antigénio, em que o anticorpo compreende uma cadeia leve derivada de um segmento génico V λ humano, um segmento génico J λ humano e um gene C κ de ratinho.

Lisboa, 2016-06-03

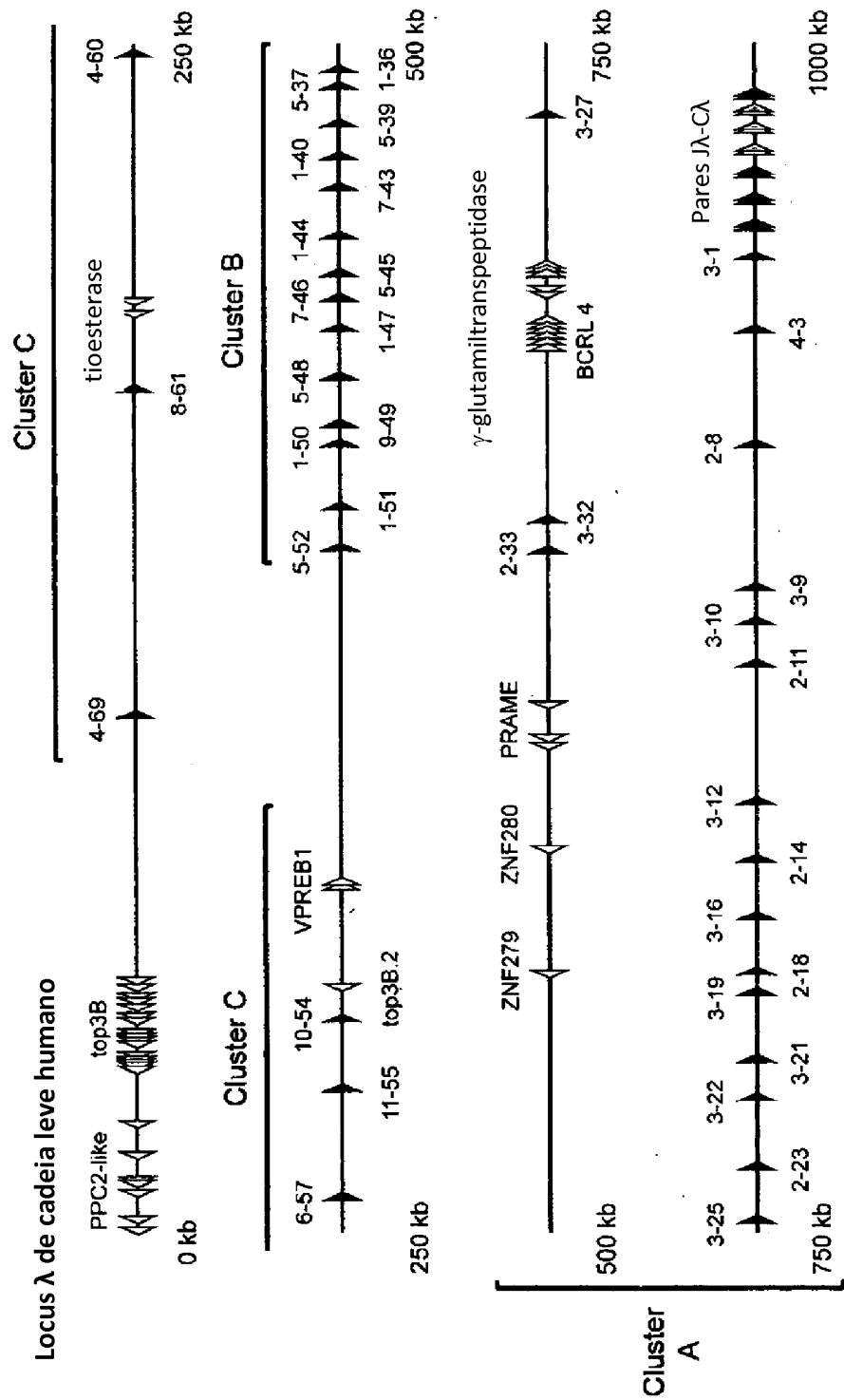


FIG. 1

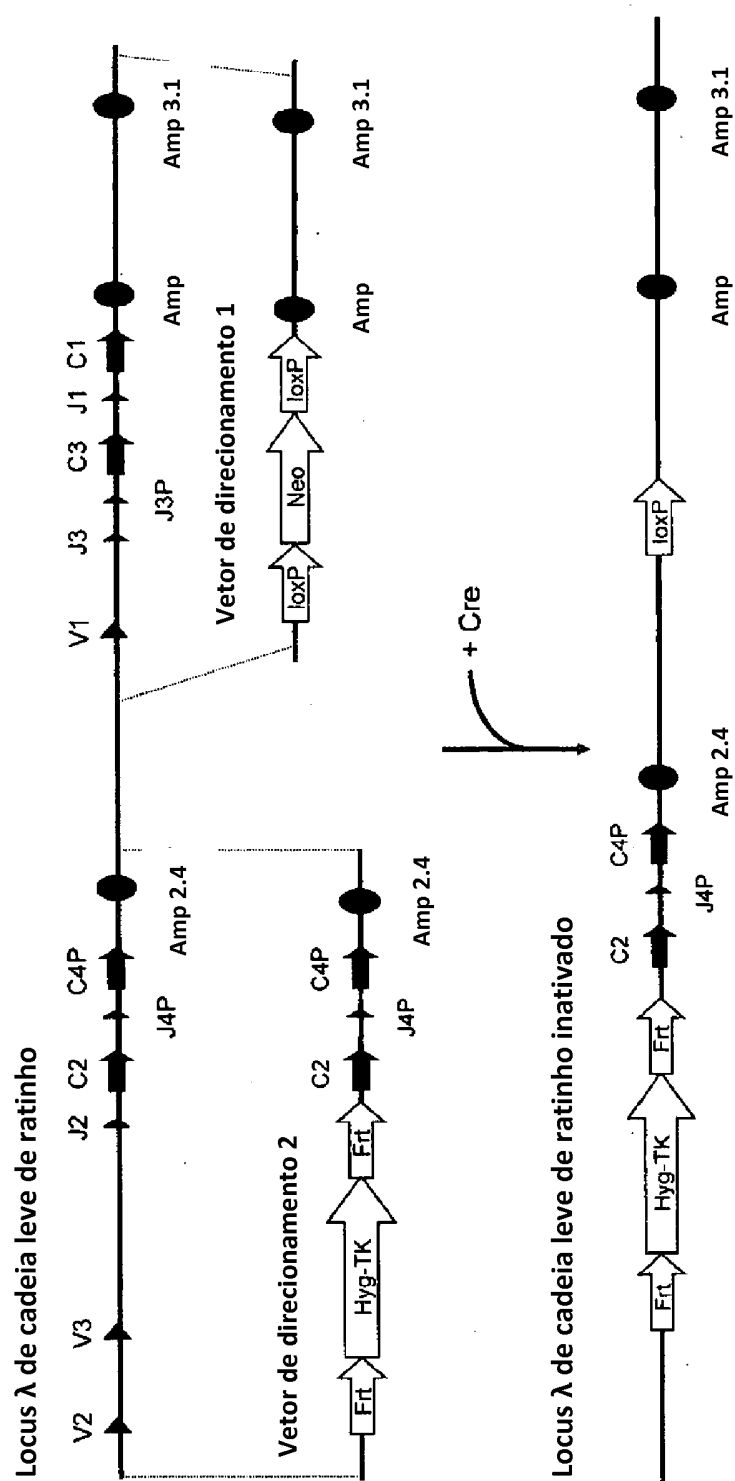


FIG. 2

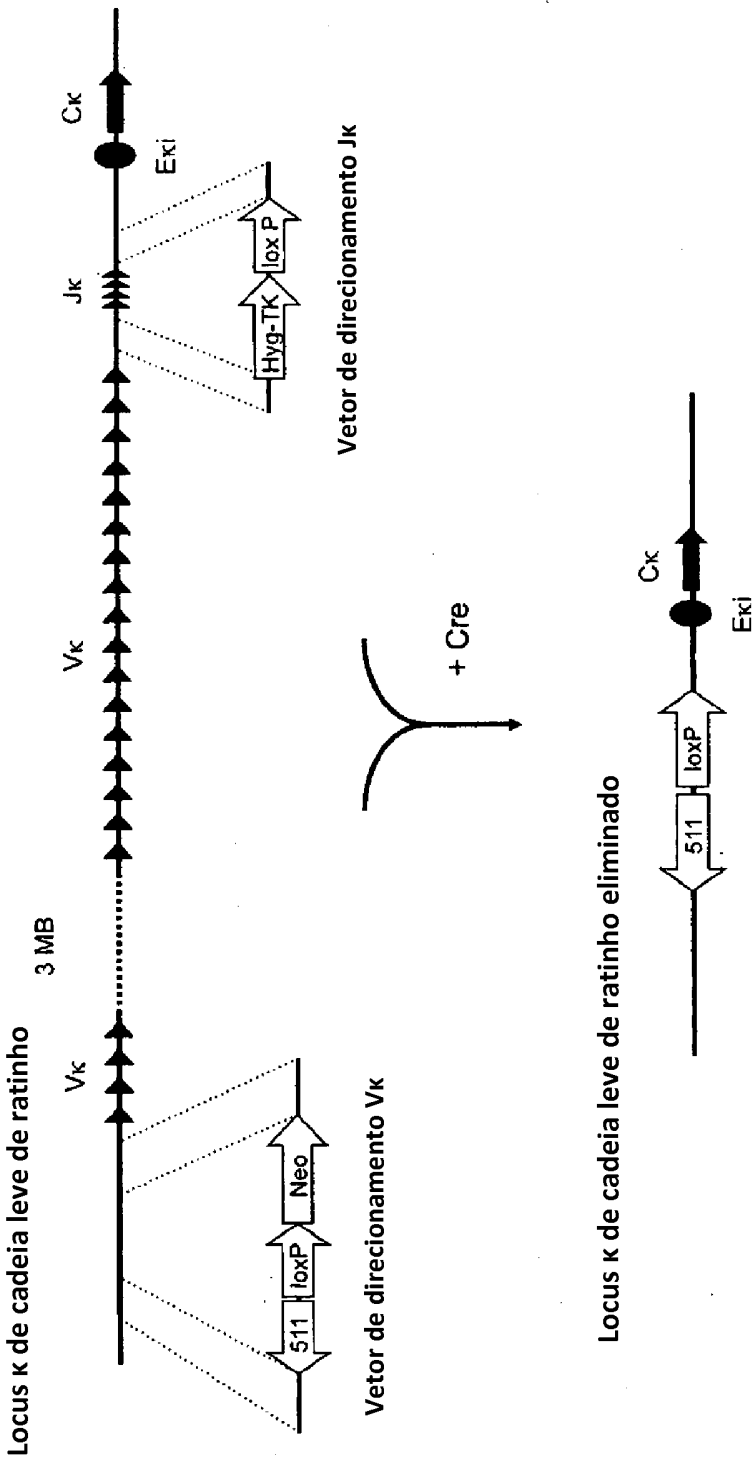


FIG. 3

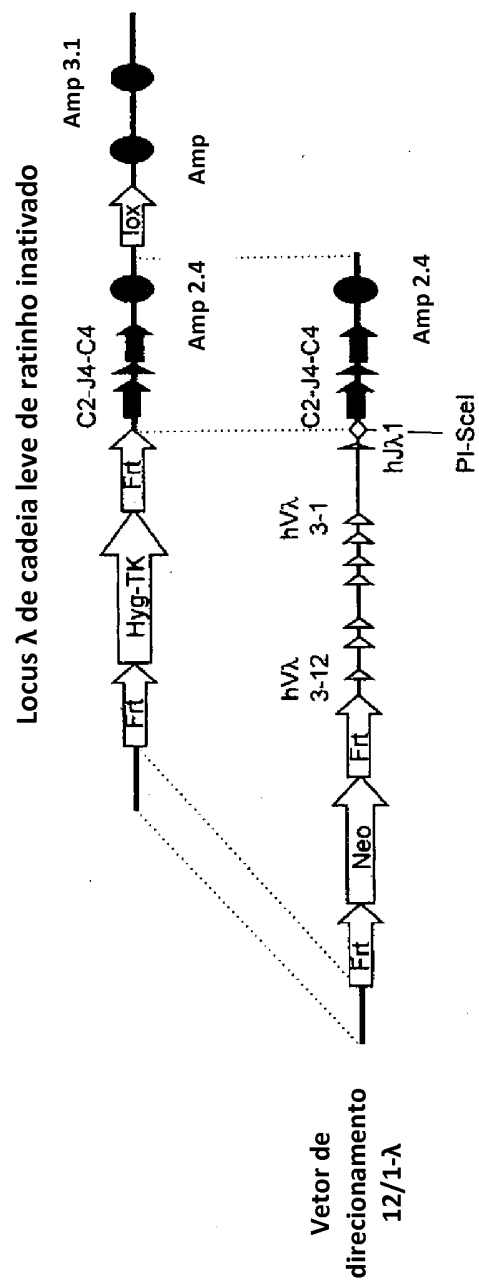


FIG. 4A

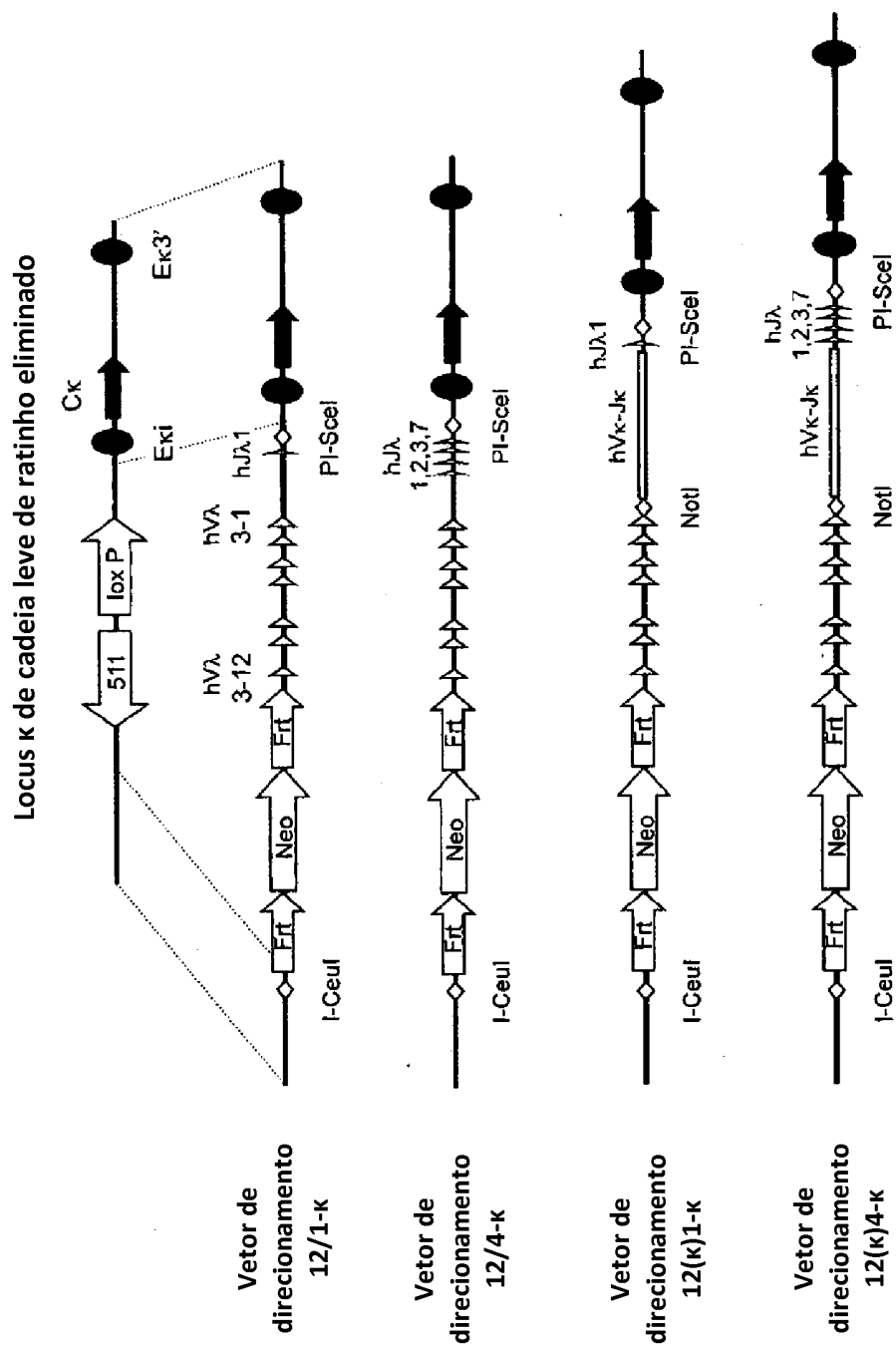


FIG. 4B

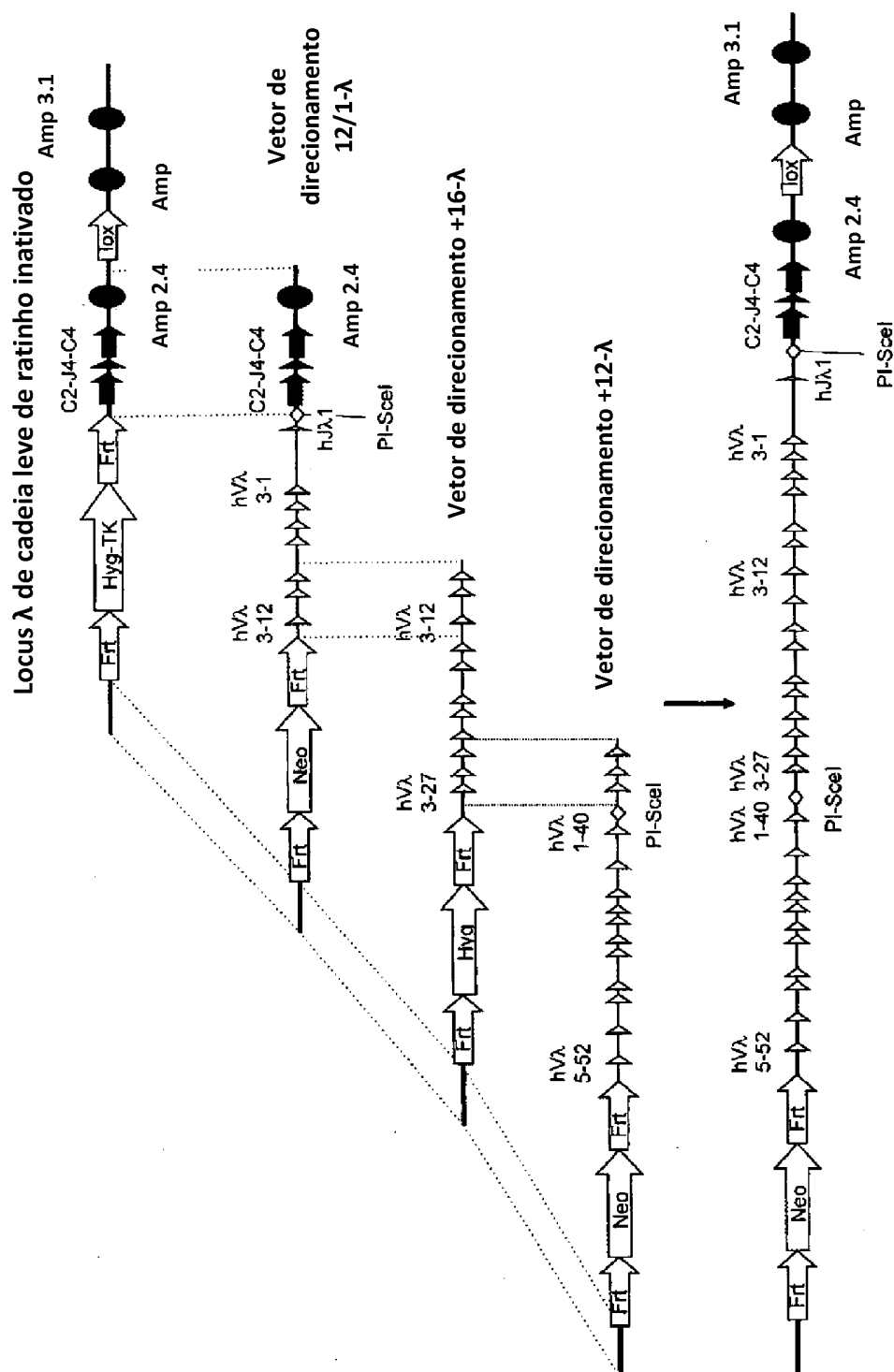


FIG. 5A

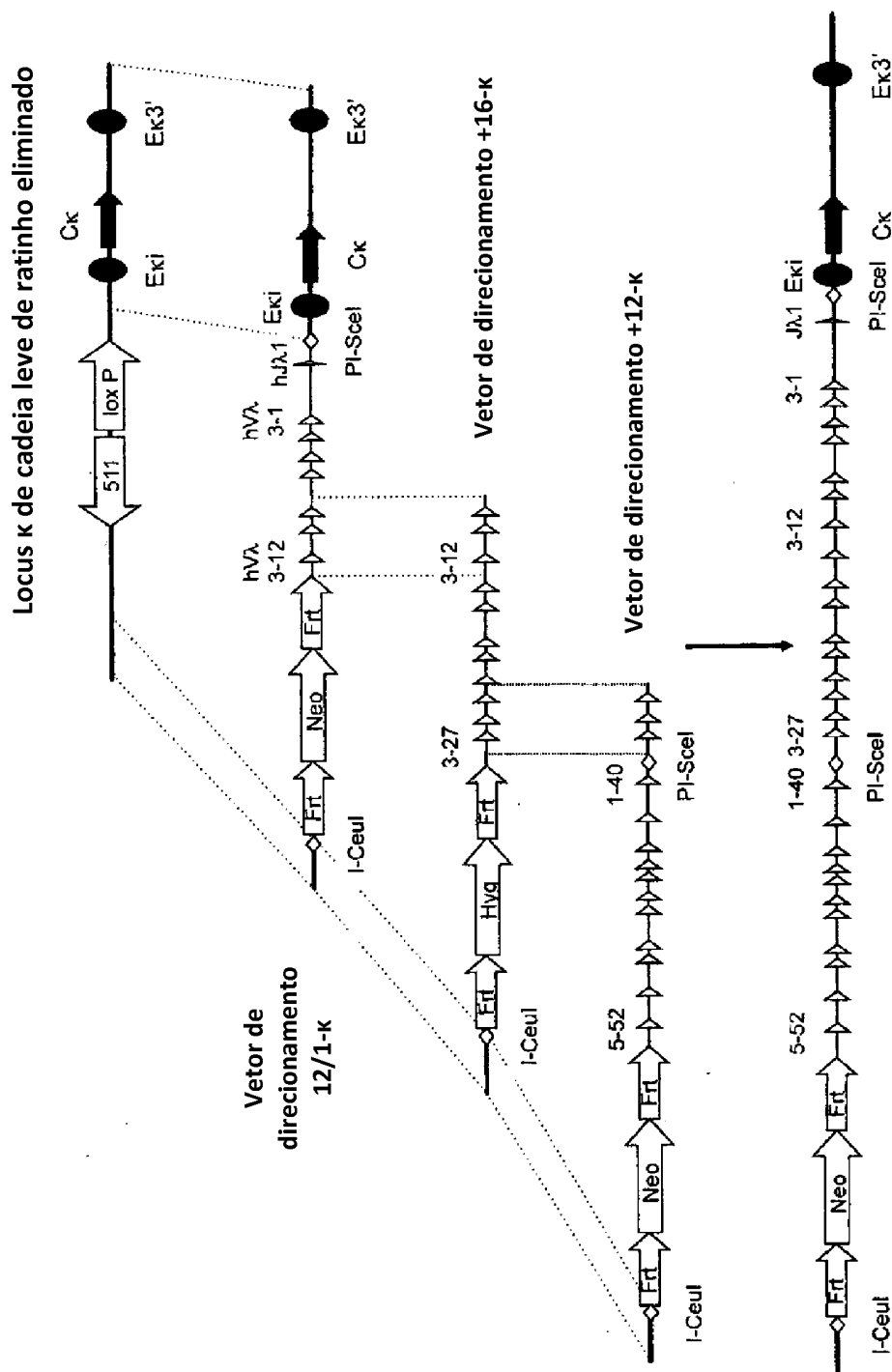


FIG. 5B

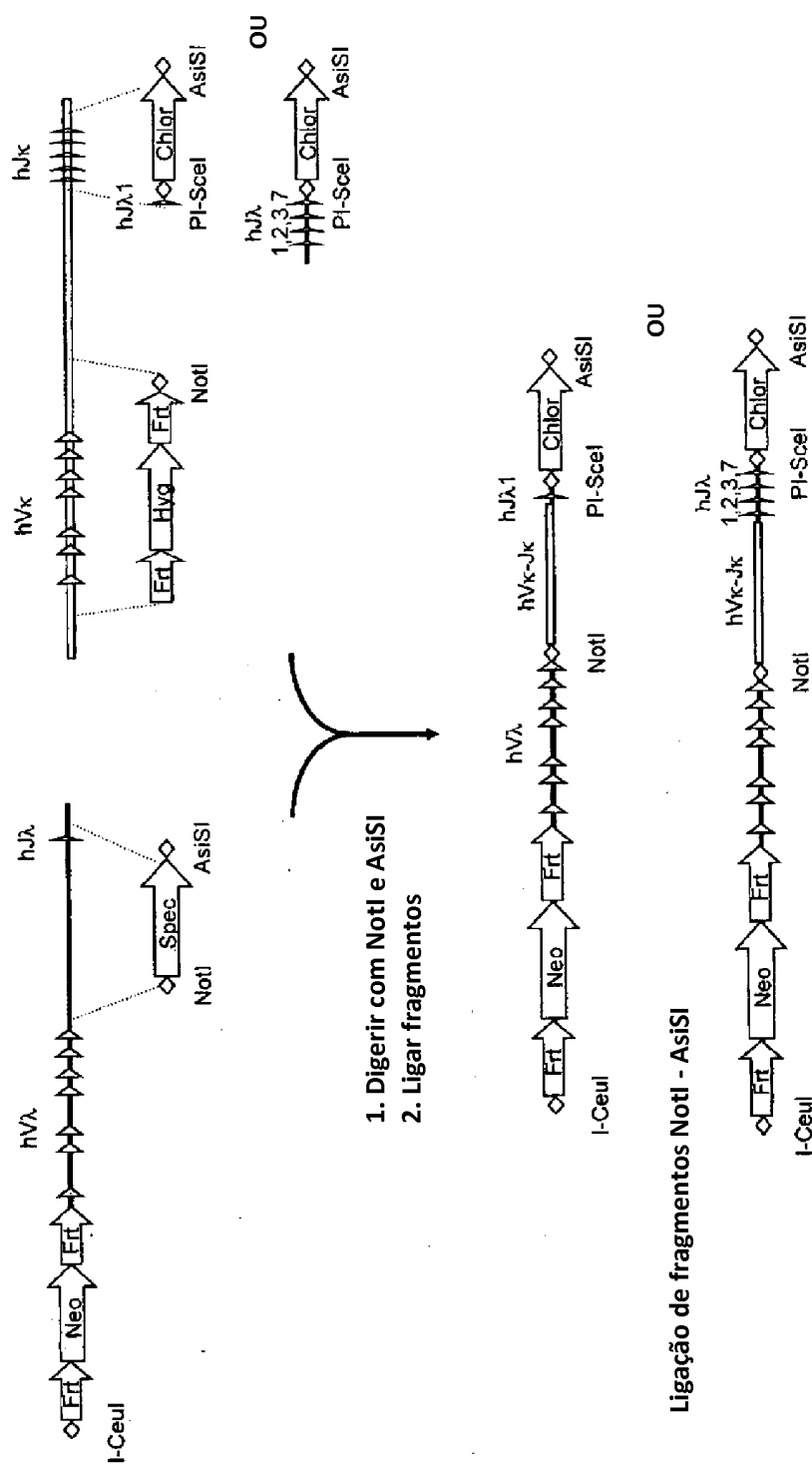


FIG. 6

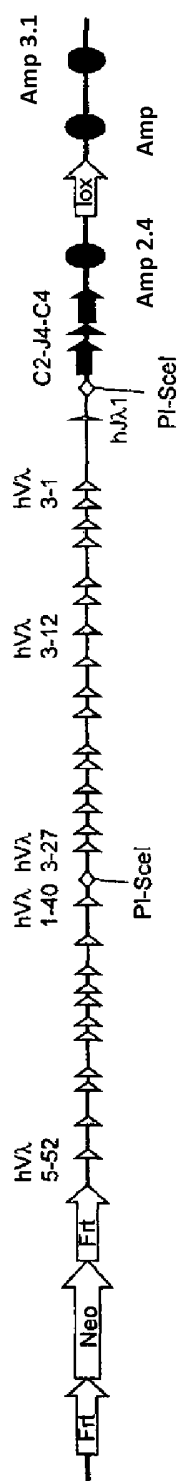


FIG. 7A

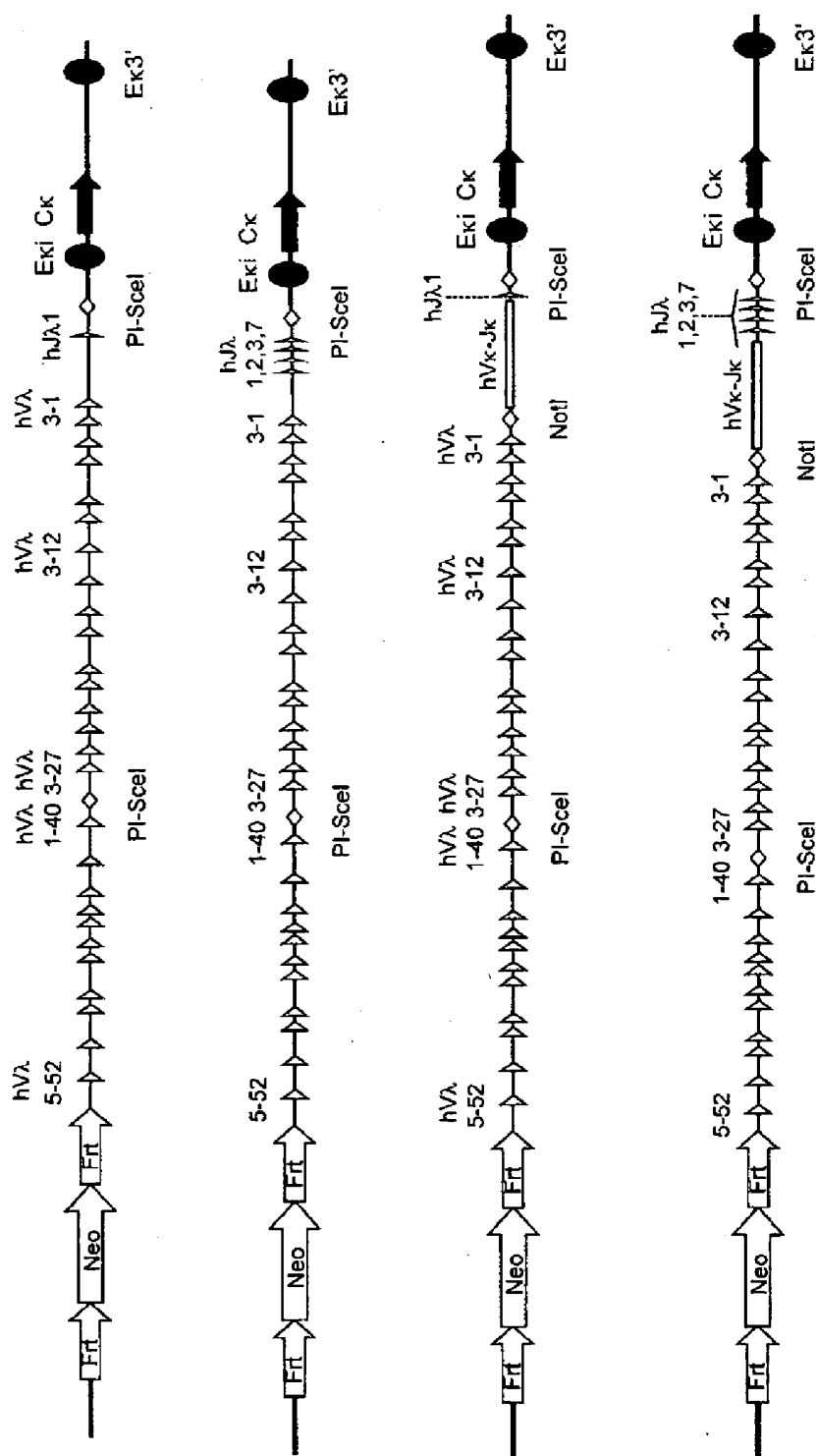


FIG. 7B

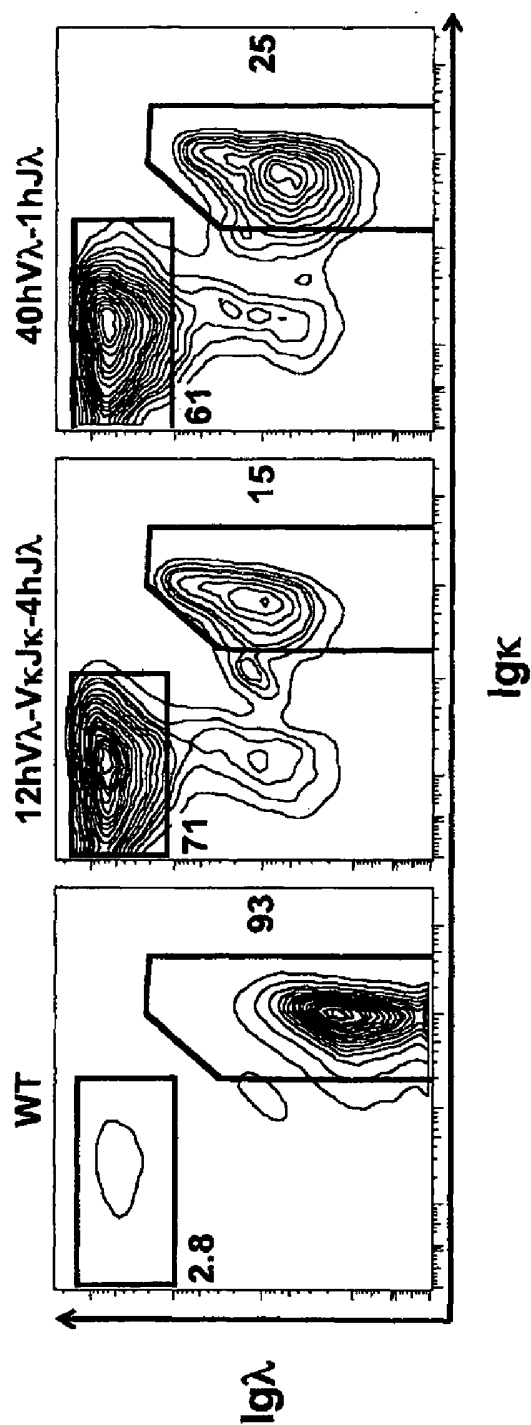


FIG. 8A

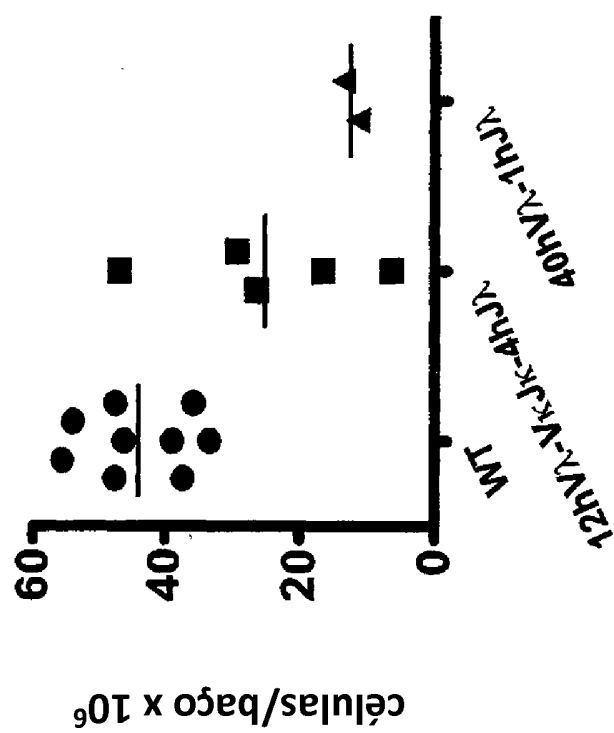


FIG. 8B

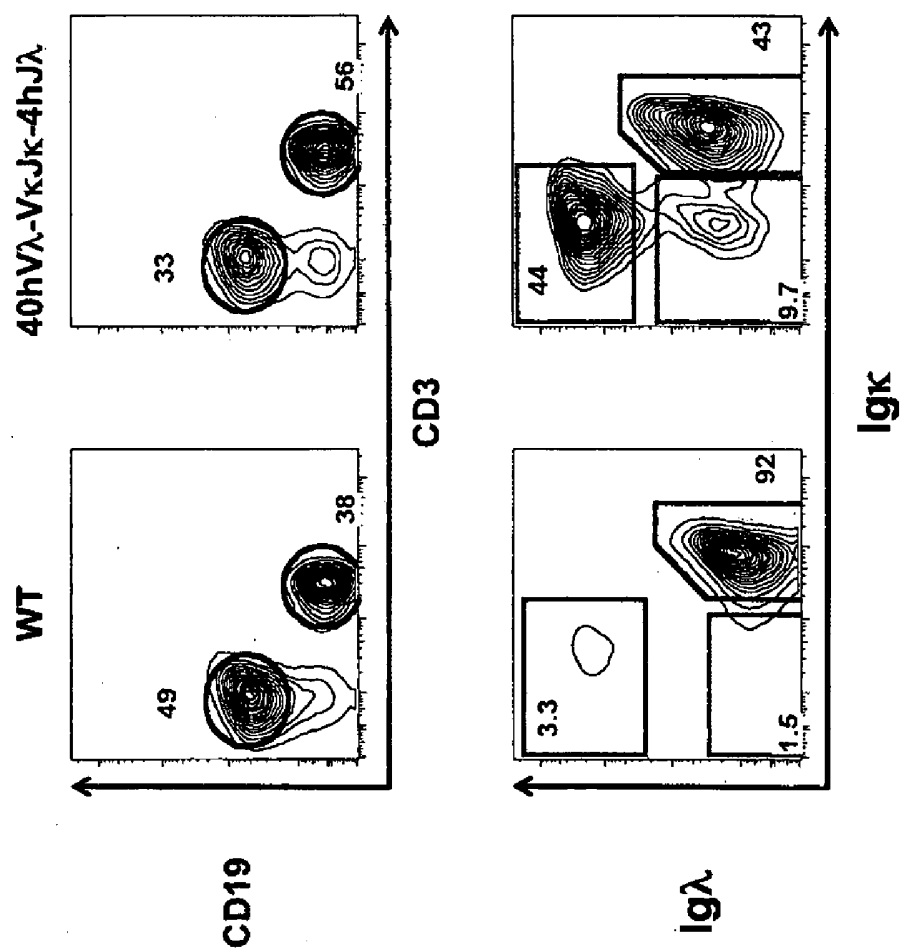


FIG. 9A

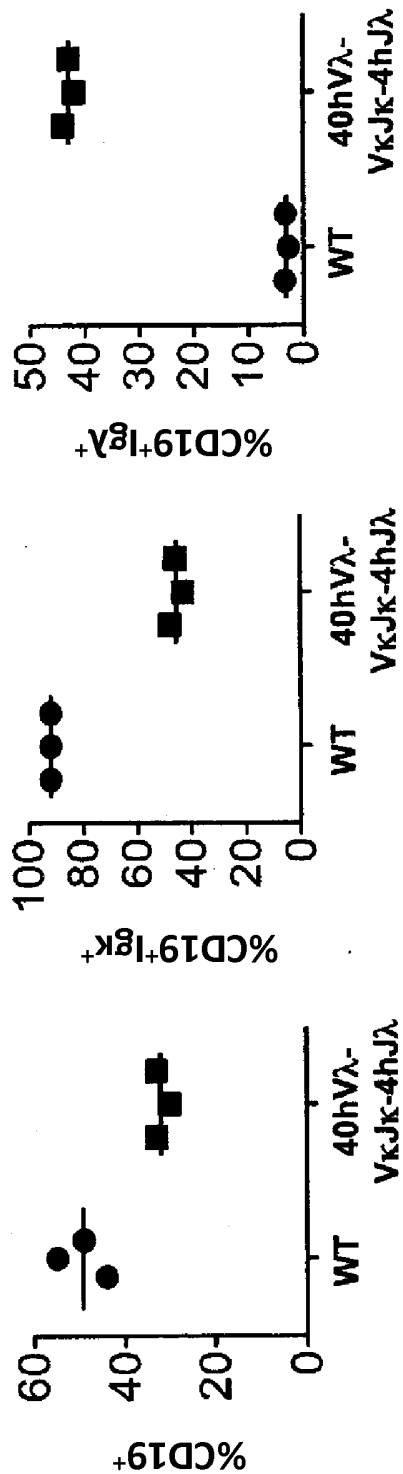


FIG. 9B

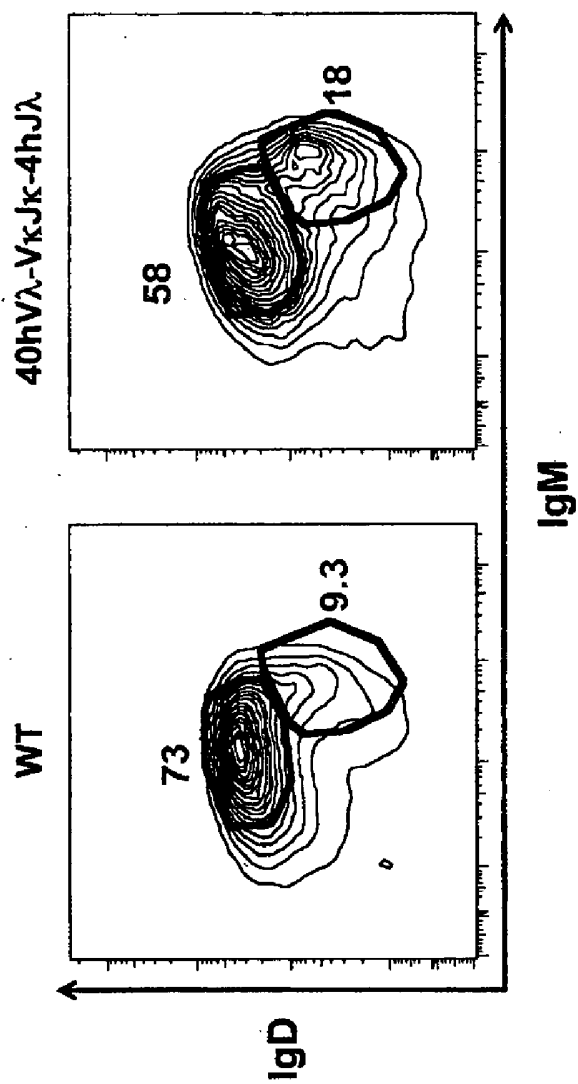


FIG. 9C

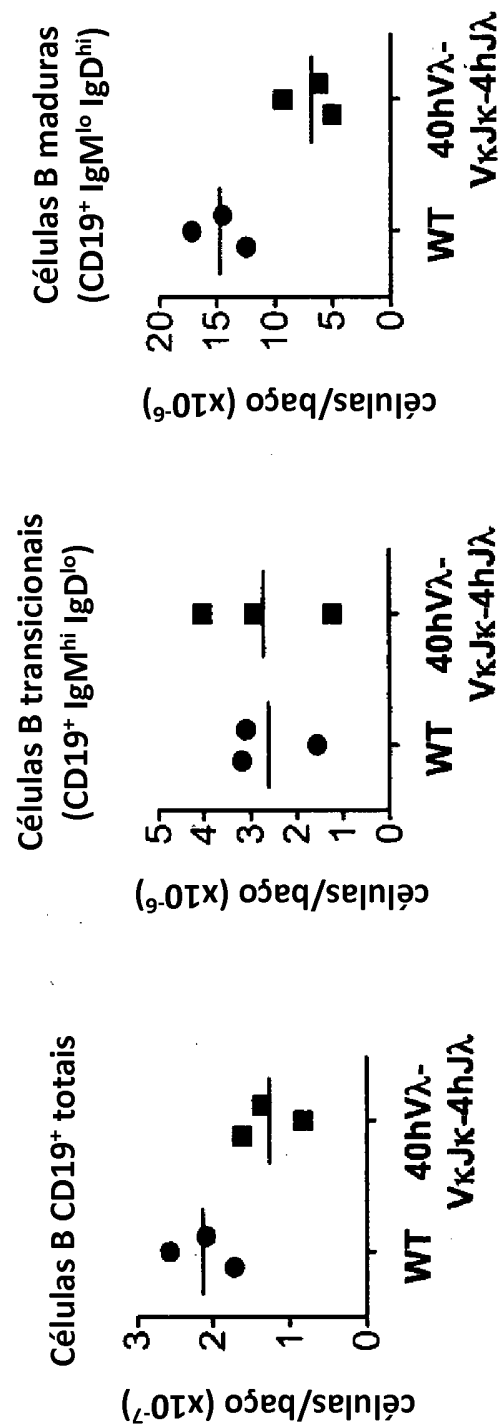


FIG. 9D

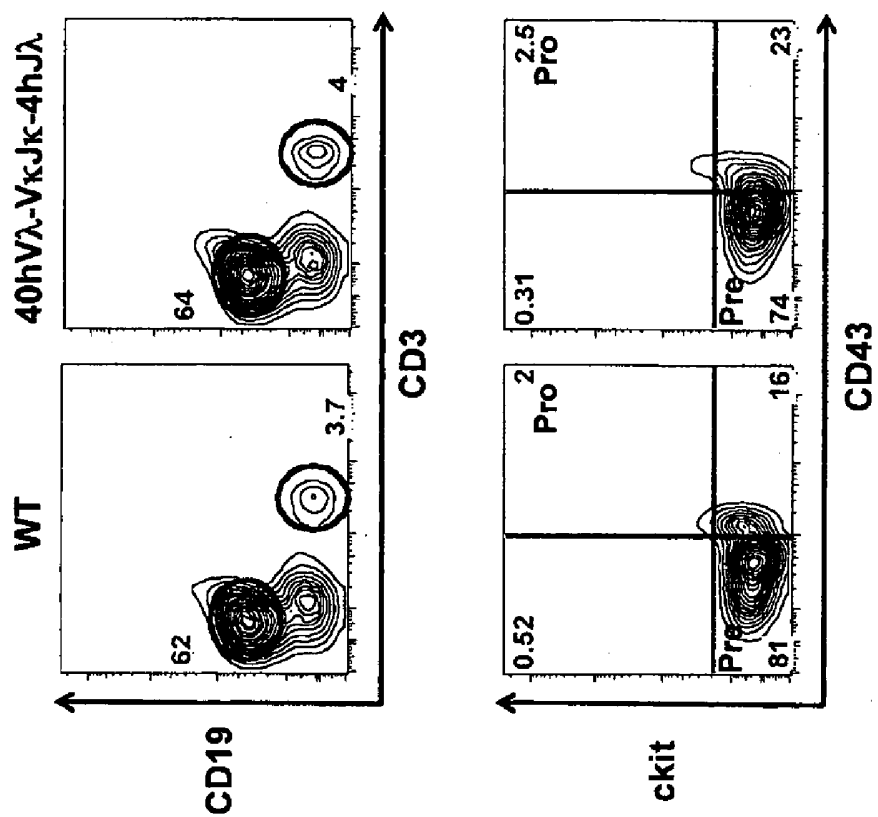


FIG. 10A

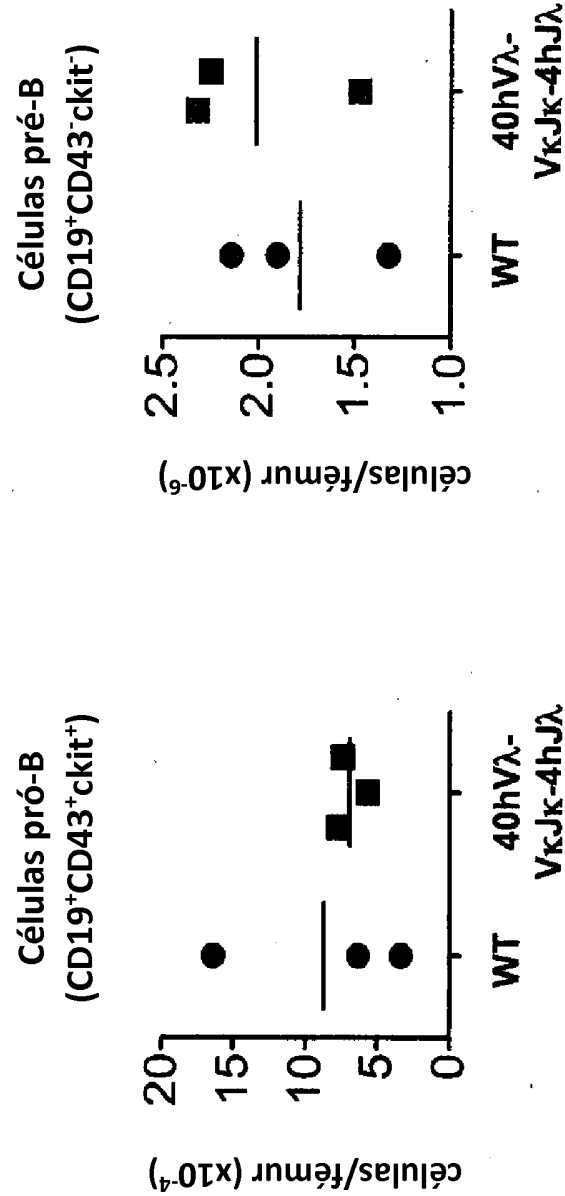


FIG. 10B

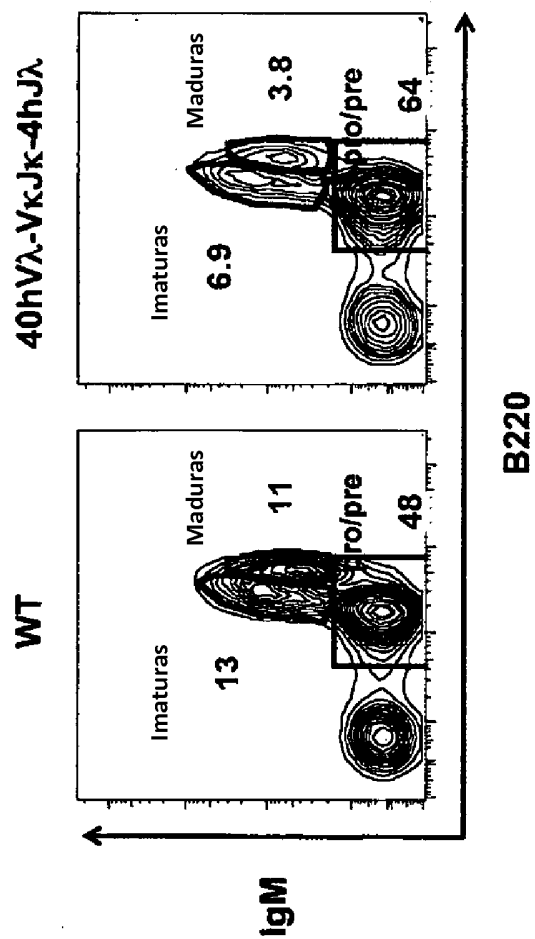


FIG. 10C

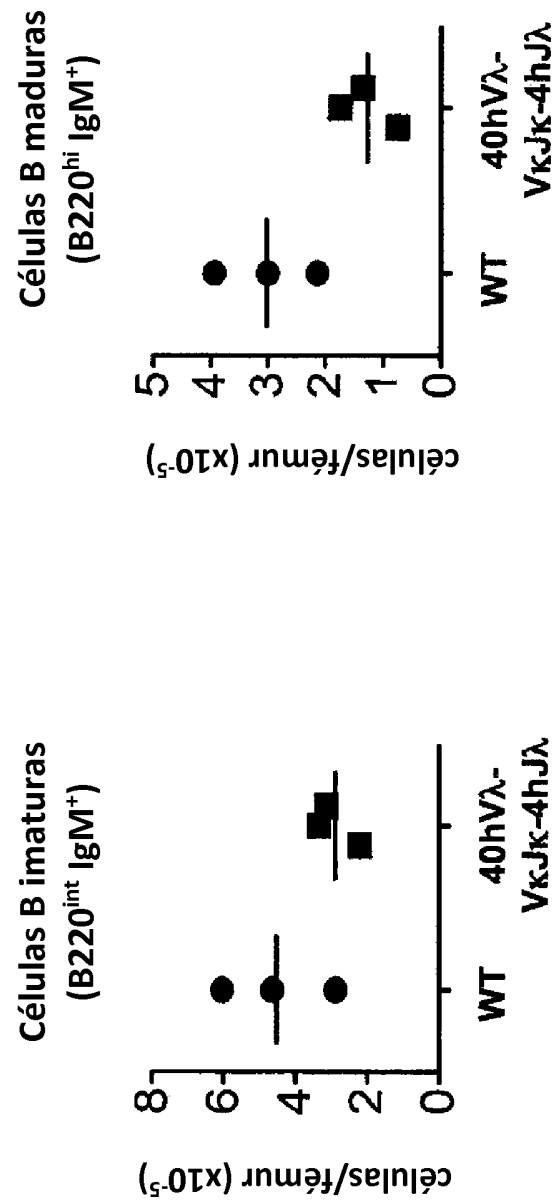


FIG. 10D

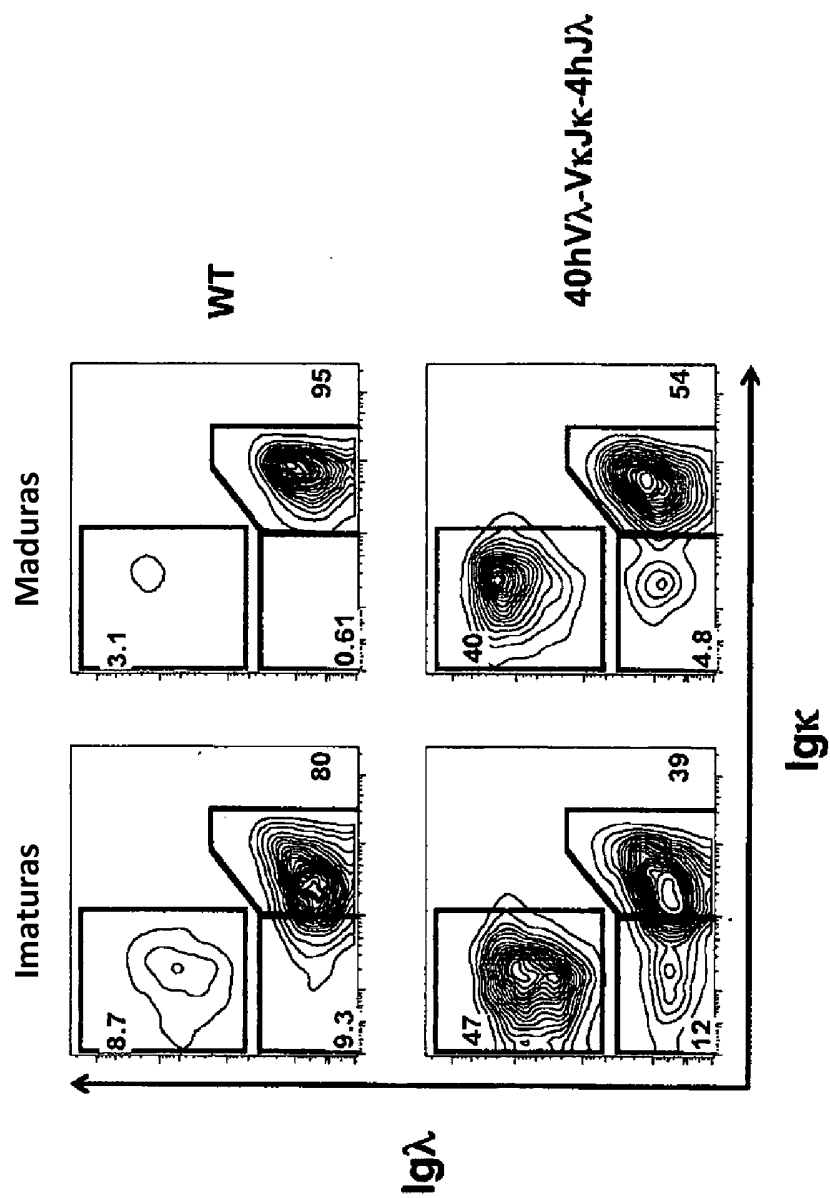


FIG. 10E

3' Vλ humano	λλ1 humano	5' Cκ de ratinho
A6	<u>GCAACAATT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAAACTGTATCCATCTTC</u>
B6	<u>GCAACAATT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAAACTGTATCCATCTTC</u>
F6	<u>GCAACAATT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAAACTGTATCCATCTTC</u>
B7	<u>GCAACAATT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAAACTGTATCCATCTTC</u>
E7	<u>GCAACAAT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAAACTGTATCCATCTTC</u>
F7	<u>GCAACAATT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAAACTGTATCCATCTTC</u>
C8	<u>GCAACAATT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAAACTGTATCCATCTTC</u>
E12	<u>CAAGTCGGTT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAAACTGTATCCATCTTC</u>
1-4	<u>TGAGTGCT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAAACTGTATCCATCTTC</u>
1-20	<u>TGAGTGCg</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAAACTGTATCCATCTTC</u>
3B43	<u>CTGAATGGT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAAACTGTATCCATCTTC</u>
5-8	<u>AGTGATAAT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAAACTGTATCCATCTTC</u>
5-19	<u>AGTGGTGCT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAAACTGTATCCATCTTC</u>
1010	<u>AGCAGCACT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAAACTGTATCCATCTTC</u>
11A1	<u>AGCAGCGCT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAAACTGTATCCATCTTC</u>
7A8	<u>GGTGGTGCT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAAACTGTATCC</u>
3A3	<u>AGTAGCACT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAAACTGTATCCATC</u>
2-7	<u>AGCAGCACT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCA</u>
FWR4	F G T G T K V T V L G A D A A P T V S I F	

FIG. 11

	3' Vλ humano	Jλ humano	5' Cκ de ratinho
5-2	CAGCCTGAGTGGTTC	TGTGTTTCGGAGGAGGCACCCGGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-5	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTCAACGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
1-3	CAGCCTGAATGGT	GCTGTGTTTCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4B-1	CAGCCTGAGTGGTC	GGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
3B-5	CAGCAGCACTGC	TGTGTTTCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
7A-1	CAGCAGTGGTAAT	GCTGTGTTTCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-1	CAGCAGTGGTAATCATAG	GGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4A-1	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTCAACGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
11A-1	CAGCAGCGCT	GTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-7	CTACTATGGTGGTGCTC	GGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-4	CTCCTATAGTGGTGCTCGa	GTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-3	GAGCAACTTCGTGT	CTGTGTTTCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
FWR4		F G G G T K L L T V L G A D A A P T V S I	

FIG. 12

	3' Vλ humano	Jλ1 humano	5' Cλ2 de ratinho
2D1	<u>GCAGGCAGCAACAATTta</u>	<u>aGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG</u>	<u>GTCAGCCCCAAGTCCCACTCCCCTCTC</u>
2D9	GACAGCAGTGGTAATCAT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GTCAGCCCCAAGTCCCACTCCCCTCTC
3E15	GACAGCAGCACTGCC	GTCCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GTCAGCCCCAAGTCCCACTCCCCTCTC
FWR4		F G T G T K V T V L G Q P K S T P T L	

FIG. 13