



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 345 580**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **96941938 .1**

96 Fecha de presentación : **10.10.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **0854917**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.07.1998**

54

Título: **Animales transgénicos no humanos capaces de producir anticuerpos heterólogos.**

30

Prioridad: **10.10.1995 US 544404**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.09.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.09.2010

73

Titular/es: **GenPharm International, Inc.**
521 Cottonwood Drive
Milpitas, California 95035, US

72

Inventor/es: **Lonberg, Nils;**
Kay, Robert, M. y
Fishwild, Diane M.

74

Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 345 580 T3

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

DESCRIPCIÓN

Animales transgénicos no humanos capaces de producir anticuerpos heterólogos.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a animales transgénicos no humanos capaces de producir anticuerpos heterólogos, a transgenes usados para producir dichos animales transgénicos, a transgenes capaces de reorganizar funcionalmente un gen D heterólogo en recombinación V-D-J, a células B inmortalizadas capaces de producir anticuerpos heterólogos, a métodos y transgenes para producir anticuerpos heterólogos de múltiples isotipos, a métodos y transgenes para producir anticuerpos heterólogos en los que una secuencia de región variable comprende una mutación somática en comparación con secuencias de región variable reorganizadas de la línea germinal, a animales transgénicos no humanos que producen anticuerpos que tienen una secuencia primaria humana y que se unen a antígenos humanos, a hibridomas generados a partir de células B de dichos animales transgénicos y a anticuerpos monoclonales expresados por dichos hibridomas.

Antecedentes de la invención

Uno de los impedimentos principales de cara al desarrollo de aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico *in vivo* para anticuerpos monoclonales en seres humanos es la inmunogenicidad intrínseca de inmunoglobulinas no humanas. Por ejemplo, cuando se administran dosis terapéuticas de anticuerpos monoclonales de roedor a pacientes humanos inmunocompetentes, los pacientes producen anticuerpos contra las secuencias de inmunoglobulina de roedor; estos anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA) neutralizan los anticuerpos terapéuticos y pueden causar una toxicidad aguda. Por lo tanto, es deseable producir inmunoglobulinas humanas que sean reactivas con antígenos humanos específicos que sean dianas terapéuticas y/o de diagnóstico prometedoras. Sin embargo, la producción de inmunoglobulinas humanas que se unen específicamente con antígenos humanos es problemática.

La presente tecnología para generar anticuerpos monoclonales implica pre-exponer o sensibilizar a un animal (habitualmente una rata o ratón) con antígeno, recoger células B de ese animal y generar una biblioteca de clones de hibridoma. Mediante la exploración en una población de hibridoma de la especificidad de unión a antígeno (idiotipo) y también la exploración de clase de inmunoglobulina (isotipo), es posible seleccionar clones de hibridoma que secreten el anticuerpo deseado.

Sin embargo, cuando los presentes métodos para generar anticuerpos monoclonales se aplican con el fin de generar anticuerpos humanos que tengan especificidades de unión por antígenos humanos, la obtención de linfocitos B que produzcan inmunoglobulinas humanas es un obstáculo serio, puesto que típicamente los seres humanos no generarán respuestas inmunes contra antígenos propios.

Por lo tanto, los presentes métodos de generación de anticuerpos monoclonales humanos que son específicamente reactivos con antígenos humanos son claramente insuficientes. Es evidente que las mismas limitaciones en la generación de anticuerpos monoclonales contra autoantígenos auténticos son aplicables cuando se usan especies no humanas como fuente de células B para generar el hibridoma.

La construcción de animales transgénicos que alberguen un transgén de inmunoglobulina heterólogo funcional es un método por el que pueden producirse anticuerpos reactivos con autoantígenos. Sin embargo, para obtener la expresión de anticuerpos terapéuticamente útiles o clones de hibridoma que produzcan dichos anticuerpos, el animal transgénico debe producir células B transgénicas que sean capaces de madurar a través de la ruta de desarrollo de linfocitos B. Dicha maduración requiere la presencia de IgM de superficie en las células B transgénicas, sin embargo se desean isotipos distintos de IgM para usos terapéuticos. Por lo tanto, existe la necesidad de transgenes y animales que alberguen dichos transgenes que sean capaces de experimentar una reorganización V-D-J funcional para generar una diversidad de recombinación y una diversidad de unión. Además, dichos transgenes y animales transgénicos incluyen preferiblemente secuencias que actúan en cis que facilitan el cambio de isotipo de un primer isotipo que es necesario para la maduración de células B a un isotipo posterior que tiene una utilidad terapéutica superior.

Varios experimentos han notificado el uso de líneas celulares transfectadas para determinar las secuencias de ADN específicas necesarias para la reorganización de genes de Ig (revisado por Lewis y Gellert (1989), *Cell*, 59, 585-588). Dichos informes han identificado secuencias supuestas y concluido que la accesibilidad de estas secuencias a las enzimas recombinasas usadas para la reorganización está modulada por la transcripción (Yancopoulos y Alt (1985), *Cell*, 40, 271-281). Las secuencias para la unión de V(D)J son, según se informa, un heptámero casi palindrómico altamente conservado y un nanómetro rico en AT peor conservado separados por un espaciador de 12 ó 23 pb (Tonegawa (1983), *Nature*, 302, 575-581; Hesse, *et al.* (1989), *Genes in Dev.*, 3, 1053-1061). Según se informa, la recombinación eficaz se produce sólo entre sitios que contienen secuencias señal de recombinación con regiones espaciadoras de longitud diferente.

La reorganización de genes de Ig, aunque se ha estudiado en células de cultivo de tejidos, no se ha examinado exhaustivamente en ratones transgénicos. Sólo se han publicado un puñado de informes que describen construcciones de ensayo de reorganización introducidas en ratones [Buchini, *et al.* (1987), *Nature*, 326, 409-411 (transgén λ de pollo sin reorganizar); Goodhart, *et al.* (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 4229-4233) (gen κ de conejo sin

ES 2 345 580 T3

reorganizar); y Bruggemann, *et al.* (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6709-6713 (cadena pesada humana-de ratón híbrida)]. Los resultados de dichos experimentos, sin embargo, han sido variables en algunos casos, produciendo una reorganización incompleta o mínima del transgén.

5 Además se ejerce una diversidad de funciones biológicas de moléculas de anticuerpo por la porción Fc de moléculas, tales como la interacción con mastocitos o basófilos por medio de Fc ϵ , y además es deseable la unión del complemento por Fc μ o Fc γ para generar una diversidad funcional de anticuerpos de una especificidad dada por variación de isotipo.

10 Aunque se han generado animales transgénicos que incorporan transgenes que codifican una o más cadenas de un anticuerpo heterólogo, no ha habido informes de transgenes heterólogos que experimenten un cambio de isotipo con éxito. Los animales transgénicos que no pueden realizar un cambio de isotipo están limitados a producir anticuerpos heterólogos de un solo isotipo y, más específicamente, están limitados a producir un isotipo que es esencial para la maduración de células B, tal como IgM y posiblemente IgD, que pueden ser de una utilidad terapéutica limitada. Por
15 lo tanto, existe la necesidad de transgenes de inmunoglobulina heterólogos y animales transgénicos que sean capaces de cambiar de un isotipo necesario para el desarrollo de células B a un isotipo que tenga una característica deseada para uso terapéutico.

Basándose en lo anterior, está claro que existe la necesidad de métodos para producir eficazmente anticuerpos
20 heterólogos, por ejemplo anticuerpos codificados por secuencias genéticas de una primera especie que se producen en una segunda especie. Más particularmente, existe la necesidad en la técnica de transgenes de inmunoglobulina heterólogos y animales transgénicos que sean capaces de experimentar una reorganización de genes V-D-J funcional que incorpore toda o una porción de un segmento génico D que contribuya a la diversidad de recombinación. Además, existe la necesidad en la técnica de transgenes y animales transgénicos que puedan soportar la recombinación V-D-J y
25 el cambio de isotipo de modo que (1) pueda producirse el desarrollo de células B funcionales y (2) puedan producirse anticuerpos heterólogos terapéuticamente útiles. También existe la necesidad de una fuente de células B que pueda usarse para generar hibridomas que produzcan anticuerpos monoclonales para uso terapéutico o de diagnóstico en la especie particular para la que se diseñan. Un transgén de inmunoglobulina heterólogo capaz de una recombinación V-D-J funcional y/o capaz de un cambio de isotipo podría satisfacer estas necesidades.

30 De acuerdo con el objeto anterior, se proporcionan animales transgénicos no humanos que son capaces de producir un anticuerpo heterólogo, tal como un anticuerpo humano.

Además, un objeto es proporcionar células B a partir de dichos animales transgénicos que sean capaces de expresar
35 anticuerpos heterólogos, donde dichas células B están inmortalizadas para proporcionar una fuente de anticuerpo monoclonal específico para un antígeno particular.

De acuerdo con este objeto anterior, un objeto adicional de la invención es proporcionar células de hibridoma que
40 sean capaces de producir dichos anticuerpos monoclonales heterólogos.

Además, un objeto de la presente memoria es proporcionar transgenes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina reorganizados y no reorganizados heterólogos, útiles para producir los animales transgénicos no humanos
mencionados anteriormente.

45 Además, un objeto de la presente memoria es proporcionar métodos para interrumpir loci de inmunoglobulina endógenos en los animales transgénicos.

Además, un objeto de la presente memoria es proporcionar métodos para inducir la producción de anticuerpos
heterólogos en el animal transgénico no humano mencionado anteriormente.

50 Un objeto adicional de la invención es proporcionar métodos para generar un repertorio de segmentos de genes de región variable de inmunoglobulina que se usa para construir uno o más transgenes de la invención.

Las referencias analizadas en el presente documento se proporcionan únicamente para su descripción antes de la
55 fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a antedatar dicha descripción en virtud de una invención anterior.

El documento WO 94/25585 describe, entre otras cosas, una cepa de ratones transgénicos en la que están inactivados los loci de cadena pesada endógenos y los loci de cadena ligera kappa. Los ratones comprenden además loci
60 de cadena pesada humana y ligera kappa, incluyendo 4 segmentos génicos V κ . El documento WO 94/25585 también describe anticuerpos de secuencia humana dirigidos contra antígenos humanos que pueden obtenerse a partir de dichos ratones transgénicos.

Descripción resumida de la invención

65 Se proporcionan animales transgénicos no humanos que son capaces de producir un anticuerpo heterólogo, tal como un anticuerpo humano. Dichos anticuerpos heterólogos pueden ser de diversos isotipos, incluyendo: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgA_{sec}, IgD o IgE. Para que dichos animales transgénicos no humanos generen una

ES 2 345 580 T3

respuesta inmune, es necesario que las células B transgénicas y células pre-B produzcan inmunoglobulina unida a superficie, particularmente del isotipo IgM (o posiblemente IgD) para efectuar desarrollo de células B y maduración estimulada por antígeno. Dicha expresión de inmunoglobulina unida a superficie IgM (o IgD) sólo es necesaria durante la fase de maduración estimulada por antígeno del desarrollo de células B, y las células B maduras pueden producir otros isotipos, aunque sólo puede producirse un solo isotipo cambiado cada vez.

Típicamente, una célula del linaje de células B producirá sólo un único isotipo cada vez, aunque un corte y empalme de ARN alternativo cis o trans, tal como el que se produce de forma natural con las formas μ_s (μ secretada) y μ_M (μ unida a membrana) y las cadenas de inmunoglobulina μ y δ , puede conducir a la expresión contemporánea de múltiples isotipos por una sola célula. Por lo tanto, para producir anticuerpos heterólogos de múltiples isotipos, específicamente los isotipos IgG, IgA e IgE terapéuticamente útiles, es necesario que se produzca cambio de isotipo. Dicho cambio de isotipo puede ser el cambio de clase clásico o puede ser el resultado de uno o más mecanismos de cambio de isotipo no clásicos.

La invención proporciona transgenes de inmunoglobulina heterólogos y animales transgénicos no humanos que albergan dichos transgenes, donde el animal transgénico es capaz de producir anticuerpos heterólogos de múltiples isotipos experimentando cambio de isotipo. El cambio de isotipo clásico se produce por acontecimientos de recombinación que implican al menos una región de secuencia de cambio en el transgén. El cambio de isotipo no clásico puede producirse, por ejemplo, por recombinación homóloga entre secuencias σ_μ humanas y Σ_μ humanas (deleción asociada con δ). Pueden producirse mecanismos de cambio no clásicos alternativos, tales como recombinación intertransgénica y/o intercromosómica, entre otras, y efectuarse el cambio de isotipo. Dichos transgenes y animales transgénicos no humanos producen un primer isotipo de inmunoglobulina que es necesario para la maduración de células B estimulada por antígeno y puede cambiar para codificar y producir uno o más isotipos heterólogos posteriores que tengan utilidad terapéutica y/o de diagnóstico. Por lo tanto, los animales transgénicos no humanos de la invención son capaces de producir, en una realización, anticuerpos IgG, IgA y/o IgE que están codificados por secuencias genéticas de inmunoglobulina humana y que también se unen a antígenos humanos específicos con gran afinidad.

La invención también incluye células B de dichos animales transgénicos que son capaces de expresar anticuerpos heterólogos de diversos isotipos, donde dichas células B están inmortalizadas para proporcionar una fuente de un anticuerpo monoclonal específico para un antígeno particular. Las células de hibridoma que proceden de dichas células B pueden servir como fuente de dichos anticuerpos monoclonales heterólogos.

La invención proporciona transgenes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina reorganizados y sin reorganizar heterólogos capaces de experimentar cambio de isotipo *in vivo* en los animales transgénicos no humanos mencionados anteriormente o en linfocitos explantados del linaje de células B de dichos animales transgénicos. Dicho cambio de isotipo puede suceder espontáneamente o inducirse por tratamiento del animal transgénico o linfocitos del linaje B explantados con agentes que promuevan el cambio de isotipo, tales como linfocinas derivadas de células T (por ejemplo, IL-4 e IFN γ).

Además, la invención incluye métodos para inducir la producción de anticuerpos heterólogos en el animal transgénico no humano mencionado anteriormente, en los que dichos anticuerpos pueden ser de diversos isotipos. Estos métodos incluyen producir una respuesta inmune estimulada por antígeno en un animal transgénico no humano para la generación de anticuerpos heterólogos, particularmente anticuerpos heterólogos de un isotipo cambiado (es decir, IgG, IgA e IgE).

Esta invención proporciona métodos por los que el transgén contiene secuencias que efectúan el cambio de isotipo, de modo que las inmunoglobulinas heterólogas producidas en el animal transgénico y los clones del anticuerpo monoclonal derivados de las células B de dicho animal pueden ser de diversos isotipos.

Esta invención proporciona además métodos que facilitan el cambio de isotipo del transgén, de modo que el cambio entre isotipos particulares puede suceder a frecuencias mucho mayores o menores o en órdenes temporales diferentes de como sucede típicamente en loci de inmunoglobulina de la línea germinal. Las regiones de cambio pueden injertarse desde diversos genes C_H y ligarse a otros genes C_H en una construcción de transgén; dichas secuencias de cambio insertadas típicamente funcionarán independientemente del gen C_H asociado de modo que el cambio en la construcción transgénica será típicamente una función del origen de las regiones de cambio asociadas. Como alternativa, o en combinación con secuencias de cambio, pueden unirse secuencias de deleción asociadas a δ con diversos genes C_H para efectuar un cambio no clásico por deleción de secuencias entre dos secuencias de deleción asociadas a δ . Por lo tanto, un transgén puede construirse de modo que un gen C_H particular se una a una secuencia de cambio diferente y de este modo se cambie más frecuentemente de lo que sucede cuando se usa la región de cambio naturalmente asociada.

Esta invención también proporciona métodos para determinar si el cambio de isotipo de secuencias transgénicas se ha producido en un animal transgénico que contiene un transgén de inmunoglobulina.

La invención proporciona construcciones transgénicas de inmunoglobulina y métodos para producir construcciones transgénicas de inmunoglobulina, de las que algunas contienen un subconjunto de secuencias de loci de inmunoglobulina de la línea germinal (que puede incluir deleciones). La invención incluye un método específico para facilitar la clonación y construcción de transgenes de inmunoglobulina, que implica un vector que emplea sitios de restricción XhoI y SalI únicos flanqueados por dos sitios NotI únicos. Este método aprovecha los extremos terminales

ES 2 345 580 T3

complementarios de los sitios de restricción XhoI y SalI y es útil para generar construcciones de gran tamaño por concatemerización ordenada de fragmentos de restricción en un vector.

5 Los transgenes de la invención incluyen un transgén de cadena pesada que comprende un ADN que codifica al menos un segmento génico variable, un segmento génico de diversidad, un segmento génico de unión y un segmento génico de región constante. El transgén de cadena ligera de inmunoglobulina comprende ADN que codifica al menos un segmento génico variable, un segmento génico de unión y un segmento génico de región constante. Los segmentos génicos que codifican los segmentos génicos de cadena ligera y pesada son heterólogos para el animal transgénico no humano en el sentido de que proceden de, o corresponden al ADN que codifica segmentos génicos de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina de una especie que no concuerda con el animal transgénico no humano. En un aspecto de la invención, el transgén se construye de modo que los segmentos génicos individuales no están reorganizados, es decir, no están reorganizados de modo que codifiquen una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina funcional. Dichos transgenes no reorganizados permiten la recombinación de los segmentos génicos (reorganización funcional) y la expresión de las cadenas ligera y/o pesada de inmunoglobulina reorganizada resultantes dentro del animal transgénico no humano cuando dicho animal se expone a un antígeno.

20 En un aspecto de la invención, los transgenes de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada heterólogos comprenden fragmentos relativamente grandes de ADN heterólogos sin reorganizar. Dichos fragmentos comprenden típicamente una porción sustancial de los segmentos C, J (y en el caso de la cadena pesada, D) de un locus de inmunoglobulina heterólogo. Además, dichos fragmentos comprenden también una porción sustancial de los segmentos génicos variables.

25 En una realización, dichas construcciones de transgén comprenden secuencias reguladoras, por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones de cambio de clase, señales de recombinación y similares, que corresponden a secuencias derivadas del ADN heterólogo. Como alternativa, dichas secuencias reguladoras pueden incorporarse en el transgén procedente de la misma especie o una especie relacionada del animal no humano usado en la invención. Por ejemplo, pueden combinarse segmentos génicos de inmunoglobulina humana en un transgén con una secuencia potenciadora de inmunoglobulina de roedor para su uso en un ratón transgénico.

30 En un método de la invención, se pone en contacto un animal transgénico no humano que contiene transgenes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera no reorganizados de la línea germinal - que experimentan unión VJC durante la diferenciación de células D - con un antígeno para inducir la producción de un anticuerpo heterólogo en una célula B de repertorio secundario.

35 También se incluyen en la invención vectores y métodos para interrumpir los loci de inmunoglobulina endógenos en el animal no humano que van a usar en la invención. Dichos vectores y métodos utilizan un transgén, preferiblemente un vector de selección positiva-negativa, que se construye de modo que dirige la interrupción funcional de una clase de segmentos génicos que codifican una cadena de inmunoglobulina pesada y/o ligera endógena para el animal no humano usado en la invención. Dichos segmentos génicos endógenos incluyen segmentos génicos de región de diversidad, de región de unión y de región constante. En este aspecto de la invención, el vector de selección positiva-negativa se pone en contacto con al menos una célula madre embrionaria de un animal no humano, después de lo cual se seleccionan las células en las que se ha integrado el vector de selección positiva-negativa en el genoma del animal no humano por medio de recombinación homóloga. Después del trasplante, el animal no humano transgénico resultante es sustancialmente incapaz de montar una respuesta inmune mediada por inmunoglobulina como resultado de la integración homóloga del vector en ADN cromosómico. Dichos animales no humanos inmunodeficientes pueden usarse después de eso para el estudio de deficiencias inmunes o usarse como el receptor de transgenes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina heterólogos.

50 La invención también proporciona vectores, métodos y composiciones útiles para suprimir la expresión de una o más especies de cadena(s) de inmunoglobulina sin interrumpir un locus de inmunoglobulina endógeno. Dichos métodos son útiles para suprimir la expresión de una o más cadenas de inmunoglobulina endógenas al tiempo que permiten la expresión de una o más cadenas de inmunoglobulina codificadas por transgén. A diferencia de la interrupción genética de un locus de cadena de inmunoglobulina endógeno, la supresión de la expresión de la cadena de inmunoglobulina no requiere la reproducción que requiere mucho tiempo que es necesaria para establecer animales transgénicos homocigotos para un locus de Ig endógeno interrumpido. Una ventaja adicional de la supresión en comparación con la interrupción génica de Ig endógena es que, en ciertas realizaciones, la supresión de cadena es reversible dentro de un animal individual. Por ejemplo, puede conseguirse supresión de cadena de Ig con: (1) transgenes que codifican y expresan ARN antisentido que hibrida específicamente con una secuencia génica de cadena de Ig endógena, (2) oligonucleótidos antisentido que hibridan específicamente con una secuencia génica de cadena de Ig endógena y (3) inmunoglobulinas que se unen específicamente a un polipéptido de cadena de Ig endógena.

65 La invención proporciona animales transgénicos no humanos que comprenden: un par homocigoto de alelos de cadena pesada endógenos funcionalmente interrumpidos, un par homocigoto de alelos de cadena ligera endógenos funcionalmente interrumpidos, al menos una copia de un transgén de cadena pesada de inmunoglobulina heterólogo y al menos una copia de un transgén de cadena pesada de inmunoglobulina heterólogo, donde dicho animal genera una respuesta de anticuerpos después de la inmunización con un antígeno, tal como un antígeno humano (por ejemplo, CD4). La invención también proporciona dicho animal transgénico no humano en el que dicho alelo de cadena pesada endógeno funcionalmente interrumpido es un *knockout* de recombinación homóloga de la región J_H, dicho alelo de

ES 2 345 580 T3

cadena ligera endógeno funcionalmente interrumpido es un *knockout* de recombinación homóloga de región J_κ, dicho transgén de cadena pesada de inmunoglobulina heterólogo es el transgén de minigen humano HCI o HC2, dicho transgén de cadena ligera heterólogo es el transgén κ humano KC2 o KC1e y donde dicho antígeno es un antígeno humano.

5

La invención también proporciona diversas realizaciones para la supresión, eliminación y/o interrupción funcional de loci de inmunoglobulina no humana endógenos.

10 La invención también proporciona ratones transgénicos que expresan tanto cadenas pesadas de secuencia humana como cadenas pesadas quiméricas que comprenden una región variable de cadena pesada de secuencia humana y una región constante de cadena pesada de secuencia murina. Dichas cadenas pesadas quiméricas se producen generalmente por cambio en trans entre un transgén humano funcionalmente reorganizado y una región constante de cadena pesada murina endógena (por ejemplo, γ1, γ2a, γ2b, γ3). Se forman anticuerpos que comprenden dichas cadenas pesadas quiméricas, típicamente en combinación con una cadena ligera de secuencia humana codificada por un transgén o una
15 cadena ligera murina endógena, en respuesta a la inmunización con un antígeno predeterminado. El ratón transgénico de estas realizaciones puede comprender células B que producen (expresan) una cadena pesada de secuencia humana en un primer punto temporal y que producen un cambio en trans para producir (expresar) una cadena pesada quimérica compuesta por una región variable humana y una región constante murina (por ejemplo, γ1, γ2a, γ2b, γ3) en un segundo punto temporal (posterior); dicha secuencia humana y cadenas pesadas quiméricas se incorporan en anticuerpos
20 funcionales con cadenas ligeras; dichos anticuerpos están presentes en el suero de dichos ratones transgénicos. Por lo tanto, repitiendo: los ratones transgénicos de estas realizaciones pueden comprender células B que expresan una cadena pesada de secuencia humana y posteriormente cambian (por cambio en trans o cambio en cis) para expresar una cadena pesada quimérica o con cambio de isotipo compuesta por una región variable humana y una región constante alternativa (por ejemplo, γ1, γ2a, γ2b, γ3 murina; γ, α, ε humana); dicha secuencia humana y cadenas pesadas quiméricas o con cambio de isotipo se incorporan en anticuerpos funcionales con cadenas ligeras (humanas o de ratón);
25 dichos anticuerpos están presentes en el suero de dicho ratón transgénico.

La invención también proporciona un método para generar un transgén de gran tamaño, comprendiendo dicho método:

30

introducir en una célula de mamífero al menos tres especies polinucleotídicas; teniendo una primera especie polinucleotídica una región recombinogénica de identidad de secuencia compartida con una segunda especie polinucleotídica, teniendo una segunda especie polinucleotídica una región recombinogénica de identidad de secuencia compartida con una primera especie polinucleotídica y una región recombinogénica de identidad de
35 secuencia compartida con una tercera especie polinucleotídica, y teniendo una tercera especie polinucleotídica una región recombinogénica de identidad de secuencia compartida con dicha segunda especie polinucleotídica.

35

Las regiones recombinogénicas son regiones de identidad de secuencia sustancial suficiente para generar recombinación homóloga *in vivo* en una célula de mamífero (por ejemplo, célula ES) y preferiblemente también en células eucariotas que no sean de mamífero (por ejemplo, células de *Saccharaomyces* y otras levaduras o células fúngicas). Típicamente, las regiones recombinogénicas tienen al menos de 50 a 100.000 nucleótidos de longitud o más, preferiblemente de 500 nucleótidos a 10.000 nucleótidos de longitud y con frecuencia tienen un porcentaje de identidad del 80-100 por ciento, frecuentemente un porcentaje de identidad del 95-100 por ciento, a menudo isogénico.

45

Las referencias analizadas en la presente memoria se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a antedatar dicha descripción en virtud de una invención anterior.

Breve descripción de las figuras

50

La Figura 1 representa las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 y regiones flanqueantes FR1, FR2, FR3 y FR4 en ADN genómico no reorganizado y ARNm expresado a partir de un gen de cadena pesada de inmunoglobulina reorganizado,

55

la Figura 2 representa el locus de la cadena λ humana,

la Figura 3 representa el locus de la cadena κ humana,

la Figura 4 representa el locus de la cadena pesada humana,

60

la Figura 5 representa una construcción transgénica que contiene un gen de IgM reorganizado ligado a un fragmento de 25 kb que contiene las regiones constantes γ3 y γ1 humanas seguidas de un fragmento de 700 pb que contiene la secuencia de potenciador 3' de cadena de rata.

65

La Figura 6 es un mapa de restricción del locus de la cadena κ humana que representa los fragmentos que se usarán para formar un transgén de cadena ligera por medio de recombinación homóloga *in vivo*.

La Figura 7 representa la construcción de pGP1.

ES 2 345 580 T3

La Figura 8 representa la construcción del poliengarce contenido en pGP1.

La Figura 9 representa los fragmentos usados para construir un transgén de cadena pesada humana de la invención.

5 La Figura 10 representa la construcción de pHIG1 y pCON1.

La Figura 11 representa los fragmentos de C γ 1 humana que se insertan en pRE3 (potenciador de rata 3') para formar pREG2.

10 La Figura 12 representa la construcción de pHIG3' y PCON.

La Figura 13 representa el fragmento que contiene segmentos de la región D humana usados en la construcción de los transgenes de la invención.

15 La Figura 14 representa la construcción de pHIG2 (plásmido que contiene segmento D).

La Figura 15 representa los fragmentos que incluyen los segmentos génicos J κ y C κ humanos usados en la construcción de un transgén de la invención.

20 La Figura 16 representa la estructura de pE μ .

La Figura 17 representa la construcción de pKapH.

25 Las Figuras 18A a 18D representan la construcción de un vector de selección positiva-negativa para interrumpir funcionalmente el locus de inmunoglobulina de cadena pesada endógeno de ratón.

Las Figuras 19A a 19C representan la construcción de un vector de selección positiva-negativa para interrumpir funcionalmente los loci de cadena ligera de inmunoglobulina endógenos de ratón.

30 Las Figuras 20A a 20E representan la estructura de un vector de dirección de cadena ligera kappa.

Las Figuras 21A a 20F representan la estructura de un vector de dirección de cadena pesada de ratón.

35 La Figura 22 representa el mapa del vector pGPe.

La Figura 23 representa la estructura del vector pJM2.

La Figura 24 representa la estructura del vector pCOR1.

40 La Figura 25 representa las construcciones transgénicas para pIGM1, pHCl1 y pHCl2.

La Figura 26 representa la estructura de p γ e2.

45 La Figura 27 representa la estructura de pVGE1.

La Figura 28 representa los resultados de ensayo de la expresión de Ig humana en un ratón transgénico pHCl.

La Figura 29 representa la estructura de pJCK1.

50 La Figura 30 representa la construcción de una región variable de cadena pesada sintética.

La Figura 31 es una representación esquemática de las construcciones de minilocus de cadena pesada pIGM1, pHCl1 y pHCl2.

55 La Figura 32 es una representación esquemática de la construcción de minilocus de cadena pesada pIGG1 y la construcción de minilocus de cadena ligera κ pKCl, pKVe1 y pKC2.

La Figura 33 representa un esquema para reconstruir genes de cadena ligera funcionalmente reorganizados.

60 La Figura 34 representa resultados de ELISA en suero.

La Figura 35 representa los resultados de un ensayo ELISA en suero de 8 ratones transgénicos.

65 La Figura 36 es una representación esquemática del plásmido pBCE1.

Las Figuras 37A-37C representan la respuesta inmune de ratones transgénicos de la presente memoria contra KLH-DNP, por medición de los niveles de IgG e IgM específicos para KLH-DNP (37A), KLH (37B) y BSA-DNP (37C).

ES 2 345 580 T3

La Figura 38 muestra datos de un ELISA que demuestran la presencia de anticuerpos que se unen a antígeno carcinoembrionario humano (CEA) y comprenden cadenas μ humanas; cada panel muestra diluciones seriadas recíprocas de muestras de suero combinadas obtenidas de ratones el día indicado después de la inmunización.

5 La Figura 39 muestra datos de un ELISA que demuestran la presencia de anticuerpos que se unen a antígeno carcinoembrionario humano (CEA) y comprenden cadenas γ humanas; cada panel muestra diluciones seriadas recíprocas de muestras de suero combinadas obtenidas de ratones el día indicado después de la inmunización.

10 La Figura 40 muestra secuencias de región variable alineadas de 23 ADNc seleccionados aleatoriamente (nucleótidos contiguos = SEC ID N°: 271, 273, 274, 276-293, 295-297 y 299-305) generados a partir de ARNm obtenido de tejido linfático de ratones transgénicos HCI inmunizados con antígeno carcinoembrionario humano (CEA) en comparación con la secuencia transgénica de línea germinal (línea superior) (nucleótidos contiguos = SEC ID N°: 269); en cada línea se muestran los cambios de nucleótidos respecto a la secuencia de línea germinal. Se indican las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada. Los nucleótidos no codificados por la línea germinal se muestran en mayúsculas. Nucleótidos de cadena J = SEC ID N°: 270, 272, 275, 294 y 298.

15 La Figura 41 muestra la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN humano (SEC ID N°: 306) denominado vk65.3, que contiene un segmento génico V_{κ} ; también se muestran las secuencias de aminoácidos deducidas de las regiones codificantes de V_{κ} (SEC ID N°: 307); las secuencias señal de recombinación y corte y empalme (heptámero/nonúmero) se muestran dentro de un recuadro.

20 La Figura 42 muestra la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN humano (SEC ID N°: 308), denominado vk65.5, que contiene un segmento génico V_{κ} ; también se muestran las secuencias de aminoácidos deducidas de las regiones codificantes de V_{κ} (SEC ID N°: 309); las secuencias señal de recombinación y corte y empalme (heptámero/nonúmero) se muestran dentro de un recuadro.

25 La Figura 43 muestra la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN humano (SEC ID N°: 310), denominado vk65.8, que contiene un segmento génico V_{κ} ; también se muestran las secuencias de aminoácidos deducidas de las regiones codificantes de V_{κ} (SEC ID N°: 311); las secuencias señal de recombinación y corte y empalme (heptámero/nonúmero) se muestran dentro de un recuadro.

30 La Figura 44 muestra la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN humano (SEC ID N°: 312), denominado vk65.15, que contiene un segmento génico V_{κ} ; también se muestran las secuencias de aminoácidos deducidas de las regiones codificantes de V_{κ} (SEC ID N°: 313); las secuencias señal de recombinación y corte y empalme (heptámero/nonúmero) se muestran dentro de un recuadro.

35 La Figura 45 muestra la formación de un minilocus de cadena ligera por recombinación homóloga entre dos fragmentos solapantes que se co-inyectan.

40 La Figura 46 muestra resultados de ELISA para anticuerpos monoclonales reactivos con CEA y antígenos que no son CEA que muestran la especificidad de unión a antígeno.

45 La Figura 47 muestra las secuencias de ADN de 10 ADNc (SEC ID N°: 314-322) amplificadas por PCR para amplificar transcritos que tengan una VDJ humana y una secuencia de región constante murina.

50 La Figura 48 muestra los resultados de ELISA para diversas diluciones de suero obtenidas a partir de ratones que llevan tanto un transgén de minilocus de cadena pesada humana como un transgén de minilocus κ humano; el ratón se inmunizó con CD4 humana y los datos mostrados representan anticuerpos reactivos con CD4 humana y que poseen epítomos κ humano, μ humano o γ humano, respectivamente.

55 La Figura 49 muestra la distribución relativa de tinción de linfocitos para μ humana o μ de ratón según se determinó por FACS para tres genotipos de ratón.

La Figura 50 muestra la distribución relativa de tinción de linfocitos para κ humana o κ de ratón según se determinó por FACS para tres genotipos de ratón.

60 La Figura 51 muestra la distribución relativa de tinción de linfocitos para λ de ratón según se determinó por FACS para tres genotipos de ratón.

La Figura 52 muestra la distribución relativa de tinción de linfocitos para λ de ratón o κ humana según se determinó por FACS para cuatro genotipos de ratón.

65 La Figura 53 muestra las cantidades de cadenas μ humana, γ humana, κ humana, μ de ratón, γ de ratón, κ de ratón y X de ratón en el suero de ratones 0011 sin inmunizar.

La Figura 54 muestra una representación de dispersión que muestra las cantidades de cadenas μ humana, γ humana, κ humana, μ de ratón, γ de ratón, κ de ratón y X de ratón en el suero de ratones 0011 sin inmunizar de diversos genotipos.

ES 2 345 580 T3

La Figura 55 muestra los títulos de anticuerpos que comprenden cadenas μ humana, γ humana o κ humana, en anticuerpos anti-CD4 en el suero tomado a las tres semanas o siete semanas post-inmunización después de la inmunización de un ratón 0011 con CD4.

5 La Figura 56 muestra una representación esquemática de los transgenes de minilocus de cadena pesada humana pHC1 y pHC2 y los transgenes de minilocus de cadena ligera pKC1, pKC1e y el transgén de minilocus de cadena ligera generado por recombinación homóloga entre pKC2 y Co4 en el sitio indicado.

La Figura 57 muestra un mapa de unión del locus de cadena ligera lambda murina según se extrae de Storb *et al.* (1989) en la obra citada; los recuadros de puntos representan un pseudogén.

La Figura 58 muestra una representación esquemática de la inactivación del locus X murino por direccionamiento de genes homólogos.

15 La Figura 59 muestra esquemáticamente la estructura de un transgén de dirección de recombinación homóloga para delecionar genes, tales como genes de la región constante de la cadena pesada.

La Figura 60 muestra un mapa del locus de la cadena pesada de ratones BALB/c según se extrae de Immunoglobulin Genes, Honjo, T, Alt, FW, y Rabbits TH (eds.) Academic Press, NY (1989) pág. 129. Los genes estructurales se muestran mediante recuadros continuos en la línea superior; la segunda y tercera líneas muestran sitios de restricción con símbolos indicados.

La Figura 61 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 313) del gen de la región constante α de locus de cadena pesada de ratón.

25 La Figura 62 muestra la construcción de un vector de cambio de la fase de lectura (plásmido B) para introducir un cambio de fase de lectura de dos pb en el gen J4 del locus de la cadena pesada murina.

La Figura 63 muestra una respuesta específica de isotipo de animales transgénicos durante la hiperinmunización. Los niveles relativos de μ y $\gamma 1$ humana reactiva se indican mediante un ensayo ELISA colorimétrico (eje y). Se inmunizaron tres animales transgénicos HCl línea 57 macho de 7-10 semanas de edad (N° 1991, N° 2356, N° 2357) en un fondo JHD homocigoto por inyecciones intraperitoneales de CEA en adyuvante de Freund. La Figura representa la unión de diluciones de 250 veces de suero combinado (recogido antes de cada inyección) a pocillos de microtitulación recubiertos con CEA.

35 Las Figuras 64A y 64B muestran la expresión de isotipo $\gamma 1$ codificado por transgén mediada por recombinación de cambio de clase. La estructura genómica de los transgenes integrados en dos hibridomas de expresión de $\gamma 1$ humana diferentes concuerda con la recombinación entre las regiones de cambio μ y $\gamma 1$. La Figura 64A muestra una transferencia de Southern de ADN digerido con PacI/SfiI aislado de tres hibridomas de expresión de transgén. De izquierda a derecha: clon 92-092-5H1-5, $\gamma 1^+/\mu^-$ humana; clon 92-90A-4G2-2, $\gamma 1^+/\mu^-$ humana; clon 92-092A-4F7-A5-2, $\gamma 1^-/\mu^+$ humana. Los tres hibridomas procedían de un ratón macho de 7 meses de edad hemocigoto para la integración HCl-57 y homocigoto para la interrupción JHD (ratón N° 1991). La mancha de transferencia se hibrida con una sonda procedente de un fragmento de ADN BglII/SfiI de 2,3 kb que abarca la mitad 3' de la región de cambio $\gamma 1$ humana. No se encuentra ningún producto de cambio en el hibridoma que expresa μ , mientras que los dos hibridomas que expresan $\gamma 1$, 92-09A-5H1-5 y 92-09A-4G2-2, contienen productos de cambio que dan como resultado fragmentos PacI/SfiI de 5,1 y 5,3 kb respectivamente. La Fig. 64B es un diagrama de dos mecanismos de delección posibles por los que puede producirse un cambio de clase de μ a $\gamma 1$. El gen μ humano está flanqueado por repeticiones directas de 400 pb ($\sigma\mu$ y $\Sigma\mu$) que pueden recombinarse para delecionar μ . El cambio de clase por este mecanismo generará siempre un fragmento PacI/SfiI de 6,4 kb, mientras que el cambio de clase por recombinación entre las regiones de cambio μ y $\gamma 1$ generará un fragmento PacI/SfiI de entre 4 y 7 kb, con variación de tamaño entre acontecimientos de cambio individuales. Los dos hibridomas que expresan $\gamma 1$ examinados en la Figura 64A parecen haber experimentado recombinación entre las regiones de cambio μ y $\gamma 1$.

55 La Figura 65 muestra cadenas pesadas de inmunoglobulina de ratón/humanas quiméricas generadas por cambio en trans. Se generaron clones de ADNc de productos de cambio en trans por transcripción inversa y amplificación por PCR de una mezcla de ARNm de bazo y ganglio linfático aislados a partir de un ratón HCl JHD transgénico hiperinmunizado (N° 2357; véase en la leyenda de la Figura 63 la descripción del animal y del programa de inmunización). Se muestra la secuencia de nucleótidos parcial de 10 clones escogidos aleatoriamente (SEC ID N°: 324-332). Las letras en minúscula indican codificado por la línea germinal, las letras en mayúsculas indican nucleótidos que no pueden asignarse a secuencias de la línea germinal conocidas; éstas pueden ser mutaciones somáticas, nucleótidos N o segmentos D truncados. Ambos tipos de impronta indican secuencias γ de ratón.

65 Las Figuras 66A y 66B muestran que el transgén VH251 reorganizado experimenta una mutación somática en un animal hiperinmunizado. La secuencia de nucleótidos parcial de los clones de ADNc de región variable de cadena pesada de IgG de ratones CH1 línea 26 que presentaban respuestas primaria en la Figura 66A y secundaria en la Figura 66B a antígeno. La secuencia de línea germinal se muestra en la parte superior (SEC ID N°: 333); se proporcionan cambios de nucleótidos a partir de la línea germinal para cada clon (Fig. 66A = SEC ID N°: 335-337, 339, 341-346, 348 y 349; Fig. 66B = SEC ID N°: 351, 353, 355-359, 361 y 363). Un período indica identidad con la secuencia de

la línea germinal, las letras mayúsculas indican origen no identificado de línea germinal. Las secuencias se agrupan de acuerdo con el uso de segmentos J. Se muestra la secuencia de línea germinal de cada uno de los segmentos J (Fig. 66A = SEC ID N°: 334, 338, 340 y 347; Fig. 66B = SEC ID N°: 350, 352, 354, 360 y 362). Las letras en minúsculas dentro de secuencias de CDR3 indican identidad con segmento D conocido incluido en el transgén de HCI. Los segmentos D asignados se indican al final de cada secuencia. Las secuencias no asignadas podrían proceder de la adición de regiones N o de una mutación somática; o en algunos casos son simplemente demasiado cortas para distinguir nucleótidos N aleatorios de segmentos D conocidos. Respuesta primaria de la Figura 66A: 13 clones de ADNc de VH251 γ escogidos aleatoriamente. A un ratón HCI línea 26-JHD hembra de 4 semanas de edad (N° 2599) se le administró una sola inyección de KLH y adyuvante completo de Freund; se aisló el ARN de células esplénicas 5 días después. La frecuencia global de mutaciones somáticas dentro del segmento V es del 0,06% (2/3.198 pb). Respuesta secundaria de la Figura 66B: 13 clones de ADNc de VH251- γ 1 escogidos aleatoriamente. A un ratón HCI línea 26-JHD hembra de 2 meses de edad (N° 3204) se le administraron 3 inyecciones de HEL y adyuvante de Freund durante un mes (una inyección primaria con adyuvante completo y refuerzos con incompleto a una semana y 3 semanas); se aisló ARN de bazo y ganglio linfático 4 meses después. La frecuencia global de mutaciones somáticas dentro del segmento V es del 1,6% (52/3.198 pb).

Las Figuras 67A y 67B muestran que la mutación somática considerable está confiada a secuencias γ 1: se produce mutación somática y cambio de clase dentro de la misma población de células B. Secuencia de nucleótidos parcial de clones de ADNc de VH251 aislados de células de bazo y ganglio linfático de ratón HCI línea 57 JHD transgénico (N° 2357) hiperinmunizado contra CEA (véase en la Figura 63 el programa de inmunización). Figura 67A: IgM: 23 clones de ADNc de VH251 μ escogidos aleatoriamente (SEC ID N°: 364-368; secuencia de la línea germinal mostrada en la parte superior = SEC ID N°: 364). Secuencia de nucleótidos de segmento de 156 pb incluyendo los restos que rodean a las CDR 1 y 2. El nivel global de mutación somática es del 0,1% (5/3.744 pb). Figura 67B: IgG: 23 clones de ADNc de VH251- γ 1 escogidos aleatoriamente (SEC ID N°: 369-391; secuencia de la línea germinal mostrada en la parte superior = SEC ID N°: 333; secuencias de cadena J = SEC ID N°: 350, 352, 360 y 362). Secuencia de nucleótidos de segmento que incluye las CDR 1 a 3 y restos circundantes. La frecuencia global de mutación somática dentro del segmento V es del 1,1% (65/5.658 pb). Para una comparación con las secuencias μ en la Figura 67A: la frecuencia de mutación para los primeros 156 nucleótidos es del 1,1% (41/5.588 pb). Véase en la leyenda de las Figuras 66A y 66B la explicación de los símbolos.

La Figura 68 indica que VH51P1 y VH56P1 muestran una mutación somática considerable en un ratón no inmunizado. La secuencia de nucleótidos parcial de los clones de ADNc de región variable de cadena pesada de IgG (SEC ID N°: 393-409, 411 y 413-415; secuencias de la línea germinal = SEC ID N°: 392, 410 y 412; secuencia de cadena J = SEC ID N°: 350, 354, 362, 352 y 354, respectivamente) de un ratón HC2 línea 2550 JHD transgénico hembra no inmunizado de 9 semanas (N° 5250). La frecuencia global de la mutación somática con los 19 segmentos de VH56p1 es del 2,2% (101/4.674 pb). La frecuencia global de mutación somática dentro del segmento VH51p1 individual es del 2,0% (5/246 pb). Véase en la leyenda de las Figuras 66A y 66B la explicación de los símbolos.

Figura 69. Ratones dobles transgénicos con loci de Ig endógenos interrumpidos contienen células B positivas para IgM κ humana. FACS de células aisladas de bazo de 4 ratones con diferentes genotipos. Columna izquierda: ratón de control (N° 9944, hembra de 6 semanas de edad JH \pm -, JC κ \pm -; loci de cadena ligera κ y pesada de ratón de tipo silvestre heterocigoto, no transgénico). Segunda columna: transgénico de cadena pesada humana (N° 9877, hembra de 6 semanas de edad JH \pm -, JC κ \pm -, HC2 línea 2550 +; homocigota para loci de cadena ligera κ y pesada de ratón interrumpida, hemicigota para transgén HC2). Tercera columna; transgénico de cadena ligera κ humana (N° 9878, hembra de 6 semanas de edad JH \pm -, JC κ \pm -, KCo4 línea 4437 +; homocigota para loci de cadena ligera κ y cadena pesada de ratón interrumpida, hemicigota para transgén KCo4). Columna derecha: doble transgénica (N° 9879, hembra de 6 semanas de edad JH \pm -m JC κ \pm -, HC2 línea 2550 +, KCo4 línea 4437+; homocigota para loci de cadena ligera κ y pesada de ratón interrumpidos, hemicigota para los transgenes HC2 y KCo4). Fila superior: esplenocitos teñidos para expresión de cadena ligera X de ratón (eje x) y cadena ligera κ humana (eje y). Segunda fila: esplenocitos teñidos para expresión de cadena pesada μ humana (eje x) y cadena ligera κ humana (eje y). Tercera fila: esplenocitos teñidos para expresión de cadena pesada μ de ratón (eje x) y cadena ligera κ de ratón (eje y). Fila inferior: histograma de esplenocitos teñidos para expresión de antígeno B220 de ratón (fluorescencia logarítmica: eje x; número de células: eje y). Para cada uno de los dos paneles de colores, el número relativo de células en cada uno de los cuadrantes visualizados se proporciona como porcentaje de una selección de parámetro e basada en tinción con yoduro de propidio y dispersión de luz. La fracción de células B220+ en cada una de las muestras presentadas en la fila inferior se proporciona como un porcentaje de la selección de dispersión de luz de linfocitos.

Figura 70. Niveles de inmunoglobulina secretada en el suero de ratones dobles transgénicos. μ , γ y κ humanas y γ y λ de ratón de 18 ratones dobles transgénicos HC2/KCo4 individuales homocigotos para interrupción de locus de cadena ligera κ y pesada endógena. Ratones: (+) HC2 línea 2550 (\sim 5 copias de HC2 por integración), KCo4 línea 4436 (1-2 copias de KCo4 por integración); (O) HC2 línea 2550, KCo4 línea 4437 (\sim 10 copias de KCo4 por integración); (x) HC2 línea 2550, KCo4 línea 4583 (\sim 5 copias de KCo4 por integración); (l) HC2 línea 2572 (30-50 copias de HC2 por integración), KCo4 línea 4437; (Δ) HC2 línea 5467 (20-30 copias de HC2 por integración), KCo4 línea 4437.

Las Figuras 71A y 71B muestran respuestas de anticuerpos humanos contra antígenos humanos. Figura 71A: Respuesta primaria contra CD4 soluble humana recombinante. Se notifican los niveles de IgM humana y cadena ligera κ humana para suero antes de la extracción de sangre (O) y post-inmunización (\bullet) de cuatro ratones dobles transgénicos. Figura 71B: se produce un cambio a IgG humana *in vivo*. Se detectó IgG humana (círculos) con anti-

ES 2 345 580 T3

IgG humana policlonal conjugado con peroxidasa usado en presencia de un exceso de 1,5 μ /ml de IgE, κ y suero de ratón normal al 1% para inhibir la reactividad cruzada inespecífica. Se detectó la cadena ligera κ humana (cuadrados) usando un reactivo anti- κ humano policlonal conjugado con peroxidasa en presencia de suero de ratón normal al 1%. Se muestra un resultado representativo de un ratón (N° 9344; HC2 línea 2550, KCo4 línea 4436). Cada punto
5 representa un promedio de pocillos por duplicado menos la absorbancia de fondo.

La Figura 72 muestra un análisis de FACS de PBL humanos con un sobrenadante de hibridoma que discrimina linfocitos CD4+ humanos de linfocitos CD8+ humanos.

10 La Figura 73 muestra IgG e IgM α -CD4 humana en suero de ratón transgénico.

La Figura 74 muestra experimentos de unión competitiva que comparan un monoclonal de hibridoma α -CD4 humano de ratón transgénico, 2C11-8, con los monoclonales RPA-TA y Leu-3A.

15 La Figura 75 muestra los datos de producción para expresión de Ig de hibridoma de 2C11-8 cultivado.

La Figura 76 muestra un conjunto solapante de insertos plasmídicos que constituyen el transgén HCo7.

20 La Figura 77A representa la secuencia de nucleótidos (SEC ID N: 416) del vector plasmídico pGP2b.

La Figura 77B representa el mapa de restricción del vector plasmídico pGP2b.

La Figura 78 (partes A y B) representa una estrategia de clonación para ensamblar transgenes de gran tamaño.

25 La Figura 79 muestra que insertos de gran tamaño son inestables en plásmidos derivados de pUC de alto número de copias.

La Figura 80 muestra el fago P1 clon P1-570. El inserto abarca la porción de la región constante de cadena pesada humana que incluye γ 3 y γ 1 junto con elementos de cambio. N, NotI; S, SalI, X, XhoI.

30 La Figura 81 muestra la expresión en suero de μ y γ 1 humanas en animales fundadores transgénicos HCo7.

La Figura 82 muestra la expresión en suero de inmunoglobulinas humanas en ratones dobles transgénicos/de doble deleción HCo7/KCo4.

35 La Figura 83 muestra la detección por RT-PCR de transcritos de γ 1 y γ 3 humanas en ARN de bazo de ratón transgénico HCo7.

La Figura 84 muestra la inducción de IgG1 e IgG3 humanas por LPS e IL-4 *in vivo*.

40 Figura 85. Aparato de electroforesis en gel de agarosa para la concentración de ADN de YAC.

Figura 86. Dos análisis FACS en color de células de médula ósea de ratones HC2/KCo5/JHD/JKD y HC2/KCo4/JHD/JKD. La fracción de células en cada una de las selecciones B220⁺/CD43⁻, B220⁺/CD43⁺ y B220⁺/IgM⁺ se proporcionan como porcentaje.

Figura 87. Análisis FACS de dos colores de células de bazo de ratones HC2/KCo5/JHD/JKD y HC2/KCo4/JHD/JKD. La fracción de células en cada una de las selecciones B220^{brillante}/IgM⁺ y B220^{apagado}/IgM⁺ se proporcionan como porcentaje.

50 Figura 88. Unión de anticuerpos monoclonales IgG κ anti-nCD4 a células SupT1 CD4+.

Figura 89. Determinación de epítomos para anticuerpos monoclonales de IgG anti-nCD4 por citometría de flujo. Se preincubaron células SupT1 con tampón (columna izquierda), RPA-T4 2,5 mg/ml (columna del medio) o Leu3a 2,5 mg/ml (columna derecha) y después con uno de los 10 anticuerpos monoclonales de IgG humana (en sobrenadante diluido 1:2) o Leu3a quimérico. Se muestran en esta figura resultados para 3 anticuerpos monoclonales de IgG humana representativos.

60 Figura 90. Inhibición de MLR por un anticuerpo monoclonal de IgG κ humana anti-CD4.

La Tabla 1 representa la secuencia del vector pGPe (SEC ID N°: 72).

La Tabla 2 representa la secuencia del gen V_H49.8 (nucleótidos = SEC ID N°: 79; aminoácidos SEC ID N°: 80).

65 La Tabla 3 representa la detección de IgM e IgG humana en el suero de ratones transgénicos de esta invención.

La Tabla 4 representa secuencias de uniones VDJ (SEC ID N°: 86-115).

ES 2 345 580 T3

La Tabla 5 representa la distribución de segmentos J incorporados en transcritos codificados por transgén pHCI respecto a segmentos J que se encuentran en linfocitos de sangre periférica de humano adulto (PBL).

5 La Tabla 6 representa la distribución de segmentos D incorporados en transcritos codificados por transgén pHCI respecto a segmentos D encontrados en linfocitos de sangre periférica de humano adulto (PBL).

La Tabla 7 representa la longitud de los péptidos CDR3 de transcritos con uniones VDJ en fase de lectura en el ratón transgénico pHCI y en PBL humanos.

10 La Tabla 8 representa las secuencias de aminoácidos esperadas de las regiones VDJ de 30 clones analizados de un transgénico pHCI.

La Tabla 9 muestra ratones transgénicos de la línea 112 que se usaron en los experimentos indicados; (+) indica la presencia del transgén respectivo, (++) indica que el animal es homocigoto para el transgén *knockout* J_{HD} .

15 La Tabla 10 muestra los genotipos de varios ratones 0011.

La Tabla 11 muestra el uso de región variable humana en hibridomas de ratones transgénicos.

20 La Tabla 12 muestra el uso de segmentos V y J de transgén.

La Tabla 13 muestra la aparición de mutación somática en el transgén de cadena pesada HC2 en ratones transgénicos.

25 La Tabla 14 muestra la identificación de segmentos V_k humanos en el YAC 4x17E1.

Tabla 15. Identificación de genes de V_k humanos expresados en la línea de ratón KCo5-9272.

Tabla 16. Niveles de secreción para anticuerpos monoclonales de IgGk humana anti-nCD4.

30 Tabla 17. Constantes de velocidad y avidéz para anticuerpos monoclonales que se unen a CD4 humano.

Tabla 18. Constantes de afinidad y velocidad de anticuerpos monoclonales humanos anti-CD4 humano.

35 Tabla 19. Constantes de avidéz y velocidad de anticuerpos monoclonales humanos anti-CD4 humano.

Tabla 20. Constantes de avidéz y velocidad presentadas para anticuerpos monoclonales anti-CD4.

40 Tabla 21. Constantes de avidéz de anticuerpos monoclonales humanos anti-CD4 humano según se determinan por citometría de flujo.

Tabla 22. Secuencia de Nucleótidos Parcial para Transcritos Funcionales.

Tabla 23. Uso de Segmento V(D)J de la Línea Germinal en Transcritos de Hibridoma.

45 Tabla 24. Cebadores, Vectores y Productos Usados en Construcción de Minigenes.

Tabla 25. Efecto de mAb Humanos sobre Linfocitos Periféricos de Chimpancé.

50 Descripción detallada

Como se ha analizado anteriormente, es deseable producir inmunoglobulinas humanas que sean reactivas con antígenos humanos específicos que sean dianas terapéuticas y/o de diagnóstico prometedoras. Sin embargo, la producción de inmunoglobulinas humanas que se unen específicamente con antígenos humanos es problemática.

55 En primer lugar, el animal inmunizado que sirve como fuente de células B debe generar una respuesta inmune contra el antígeno presentado. Para que un animal genere una respuesta inmune, el antígeno presentado debe ser extraño y el animal no debe ser tolerante al antígeno. Por lo tanto, por ejemplo, si se desea producir un anticuerpo monoclonal humano con un idiotipo que se una a una proteína humana, la auto-tolerancia evitará que un ser humano inmunizado genere una respuesta inmune sustancial contra la proteína humana, puesto que los únicos epítomos del antígeno que pueden ser inmunogénicos serán los que sean el resultado del polimorfismo de la proteína dentro de la población humana (epítomos alogénicos).

65 En segundo lugar, si el animal que sirve como fuente de células B para formar un hibridoma (un ser humano en el ejemplo ilustrativo dado) genera una respuesta inmune contra un autoantígeno auténtico, puede obtenerse como resultado una enfermedad autoinmune grave en el animal. En caso de que se usaran seres humanos como fuente de células B para un hibridoma, dicha autoinmunización se consideraría no ética por la normativa contemporánea. Por lo tanto, el desarrollo de hibridomas que secreten cadenas de inmunoglobulina humanas específicamente reactivas con

antígenos humanos predeterminados es problemático, ya que es necesaria una fuente fiable de células B secretoras de anticuerpos humanos que pueda provocar una respuesta de anticuerpos contra antígenos humanos predeterminados.

Una metodología que puede usarse para obtener anticuerpos humanos que sean específicamente reactivos con antígenos humanos es la producción de un ratón transgénico que albergue las construcciones transgénicas de inmunoglobulina humana de esta invención. En resumen, se emplean transgenes que contienen todos o porciones de los loci de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humana o transgenes que contienen "miniloci" sintéticos (descritos a continuación y en las solicitudes en trámite junto con la presente U.S.S.N. 08/352.322, presentada el 7 de diciembre de 1994, U.S.S.N. 07/990.860, presentada el 16 de diciembre de 1992, U.S.S.N. 07/810.279, presentada el 17 de diciembre de 1991, U.S.S.N. 07/904.068, presentada el 23 de junio de 1992; U.S.S.N. 07/853.408, presentada el 18 de marzo de 1992, U.S.S.N. 07/574.748, presentada el 29 de agosto de 1990, U.S.S.N. 07/575.962, presentada el 31 de agosto de 1990, y PCT/US91/06185, presentada el 28 de agosto de 1991, incorporándose cada una en la presente memoria como referencia) que comprenden elementos funcionales esenciales de los loci de cadena ligera y pesada humana, para producir un animal transgénico no humano. Dicho animal transgénico no humano tendrá la capacidad de producir cadenas de inmunoglobulina que estén codificadas por genes de inmunoglobulina humanos y además será capaz de generar una respuesta inmune contra antígenos humanos. Por lo tanto, dichos animales transgénicos pueden servir como fuente de sueros inmunes reactivos con antígenos humanos especificados, y pueden fusionarse células B de dichos animales transgénicos con células de mieloma para producir hibridomas que secreten anticuerpos monoclonales que estén codificados por genes de inmunoglobulina humanos y que sean específicamente reactivos con antígenos humanos.

Anteriormente se ha notificado la producción de ratones transgénicos que contienen diversas formas de genes de inmunoglobulinas. Se han usado genes de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina de ratón reorganizados para producir ratones transgénicos. Además, se han expresado genes de Ig humana funcionalmente reorganizados que incluyen la región constante μ o $\gamma 1$ en ratones transgénicos. Sin embargo, los experimentos en los que el transgén comprende genes de inmunoglobulina no reorganizados (V-D o V-J no reorganizado) han sido variables, produciendo en algunos casos una reorganización mínima o incompleta del transgén. Sin embargo, no existen ejemplos publicados de transgenes de inmunoglobulina reorganizados o no reorganizados que experimenten un cambio de isotopo satisfactorio entre genes C_H dentro de un transgén.

La invención también proporciona un método para identificar hibridomas candidatos que secreten un anticuerpo monoclonal que comprenda una cadena de inmunoglobulina humana consistente esencialmente en una secuencia VDJ humana en unión polipeptídica a una secuencia de región constante humana. Dichos hibridomas candidatos se identifican a partir de una combinación de clones de hibridoma que comprende: (1) clones de hibridoma que expresan cadenas de inmunoglobulina que consisten esencialmente en una región VDJ humana y una región constante humana, y (2) hibridomas con cambio en trans que expresan cadenas de inmunoglobulina heterohíbridas que consisten esencialmente en una región VDJ humana y una región constante murina. El sobrenadante o sobrenadantes de clones de hibridoma individuales o combinados se ponen en contacto con un antígeno predeterminado, típicamente un antígeno que se inmoviliza por adsorción sobre un sustrato sólido (por ejemplo, un pocillo de microtitulación) en condiciones de unión para seleccionar anticuerpos que tengan la especificidad de unión a antígeno predeterminada. Un anticuerpo que se une específicamente a regiones constantes humanas también se pone en contacto con el sobrenadante de hibridoma y el antígeno predeterminado en condiciones de unión de modo que el anticuerpo se une selectivamente al menos a un epítipo de región constante humana pero no se une sustancialmente a epítipos de región constante murina; formándose por lo tanto complejos que consisten esencialmente en sobrenadante de hibridoma (anticuerpo monoclonal transgénico) unido a un antígeno predeterminado y a un anticuerpo que se une específicamente a regiones constantes humanas (y que puede estar marcado con un marcador o indicador detectable). La detección de la formación de dichos complejos indica clones o combinaciones de hibridomas que expresan una cadena de inmunoglobulina humana.

En una realización preferida de la invención, la inmunoglobulina anti-región constante humana usada en la exploración reconoce específicamente una región constante de isotipo no μ , no δ , preferiblemente de isotipo α o ϵ , más preferiblemente de isotipo γ . Se prefieren anticuerpos monoclonales del isotipo γ (i) debido a que las características de las inmunoglobulinas IgG son preferibles a las de las inmunoglobulinas IgM para algunas aplicaciones terapéuticas (por ejemplo, debido al menor tamaño de los dímeros de IgG en comparación con los pentámeros de IgM) y (ii) porque el proceso de mutación somática se correlaciona con el cambio de clase de la región constante μ respecto a las regiones constantes no μ (por ejemplo, γ). Las inmunoglobulinas seleccionadas de la población de inmunoglobulinas que han experimentado cambio de clase (por ejemplo, IgG) tienden a unirse al antígeno con mayor afinidad que las inmunoglobulinas seleccionadas de la población que no ha experimentado cambio de clase (por ejemplo, IgM). Véase, por ejemplo, Lonberg y Huszar. Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995) que se incorpora en la presente memoria como referencia. En una realización, primero se exploran los hibridomas candidatos con respecto a la región constante de isotipo γ y después se explora la combinación de hibridomas que expresan IgG para determinar la unión específica al antígeno predeterminado.

Por lo tanto, de acuerdo con el método, un ratón transgénico de la invención se inmuniza con el antígeno predeterminado para inducir una respuesta inmune. Se recogen células B del ratón y se fusionan con células inmortales para producir hibridomas. Los hibridomas se exploran primero para identificar hibridomas individuales que secreten Ig de un isotipo no-mu, no-delta (por ejemplo, IgG). Este conjunto de hibridomas se explora después para determinar la unión específica al antígeno predeterminado de interés. La exploración se realiza usando técnicas convencionales como se describe en, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva

ES 2 345 580 T3

York (1988). Usando este método es posible identificar inmunoglobulinas de alta afinidad (por ejemplo, K_a superior a aproximadamente 10^7 M^{-1}) de forma práctica y eficaz.

Definiciones

5 Como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo” se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas polipeptídicas ligeras y dos cadenas polipeptídicas pesadas. Cada una de las cadenas polipeptídicas ligera y pesada contiene una región variable (generalmente la porción amino terminal de la cadena polipeptídica) que contiene un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Cada una de las cadenas polipeptídicas ligera y pesada también comprende una región constante de las cadenas polipeptídicas (generalmente, la porción carboxilo terminal) que pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador incluyendo diversas células del sistema inmune, algunas células fagocíticas y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico.

15 Como se usa en la presente memoria, un “anticuerpo heterólogo” se define en relación con el organismo no humano transgénico que produce dicho anticuerpo. Se define como un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ADN codificante que se corresponde con la que se encuentra en un organismo que no consiste en el animal transgénico no humano y generalmente de una especie distinta de la del animal transgénico no humano. Como se usa en la presente memoria, un “anticuerpo heterohíbrido” se refiere a un anticuerpo que tiene una cadena ligera y pesada de orígenes de organismo diferente. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una cadena pesada humana asociada con una cadena ligera murina es un anticuerpo heterohíbrido. Como se usa en la presente memoria, el término “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG₁) que está codificada por genes de la región constante de la cadena pesada. Como se usa en la presente memoria, el “cambio de isotipo” se refiere al fenómeno por el que la clase o isotipo de un anticuerpo cambia de una clase de Ig a una de las otras clases de Ig. Como se usa en la presente memoria, “isotipo no cambiado” se refiere a la clase isotípica de cadena pesada que se produce cuando no ha tenido lugar un cambio de isotipo; el gen C_H que codifica el isotipo no cambiado es típicamente el primer gen C_H inmediatamente cadena abajo del gen VDJ funcionalmente reorganizado.

30 Como se usa en la presente memoria, la expresión “secuencia de cambio” se refiere a las secuencias de ADN responsables de la recombinación de cambio. Una secuencia “donante de cambio”, típicamente una región de cambio μ , estará en posición 5' (es decir, cadena arriba) con respecto a la región de construcción que se delecionará durante la recombinación de cambio. La región “acceptora de cambio” estará entre la región de construcción que se delecionará y la región constante de sustitución (por ejemplo, γ , ϵ , etc.). Puesto que no existe un sitio específico en el que siempre se producirá la recombinación, la secuencia génica final típicamente no será predecible a partir de la construcción.

35 Como se usa en la presente memoria, la expresión “patrón de glicosilación” se define como el patrón de unidades de carbohidrato que se unen covalentemente a una proteína, más específicamente a una proteína de inmunoglobulina. Un patrón de glicosilación de un anticuerpo heterólogo puede caracterizarse como un patrón sustancialmente similar a los patrones de glicosilación que aparecen de forma natural en anticuerpos producidos por la especie del animal transgénico no humano, cuando un experto en la materia reconozca el patrón de glicosilación del anticuerpo heterólogo como más similar a dicho patrón de glicosilación en la especie de animal transgénico no humano que en la especie de la que proceden los genes C_H del transgén.

45 Como se usa en la presente memoria, la expresión “unión específica” se refiere a la propiedad del anticuerpo: (1) de unirse a un antígeno predeterminado con una afinidad de al menos $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ y (2) de unirse preferentemente al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces superior a su afinidad por la unión a un antígeno inespecífico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

50 La expresión “origen natural”, como se usa en la presente memoria según se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse a partir de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente por el hombre en el laboratorio es de origen natural.

55 El término “reorganizado”, como se usa en la presente memoria, se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada en el que un segmento V se sitúa inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio de V_L o V_H completo, respectivamente. Un locus de gen de inmunoglobulina reorganizado puede identificarse por comparación con ADN de la línea germinal; un locus reorganizado tendrá al menos un elemento de homología heptamérico/nonamérico recombinado.

60 Las expresiones “no reorganizado” o “configuración de la línea germinal”, como se usan en la presente memoria en relación con un segmento V, se refieren a la configuración en la que el segmento V no está recombinado de modo que sea inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

65 En el caso de los ácidos nucleicos, la expresión “homología sustancial” indica que dos ácidos nucleicos o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean óptimamente y se comparan, son idénticos con inserciones o delecciones de nucleótidos apropiadas en al menos aproximadamente el 80% de los nucleótidos, habitualmente al menos aproximadamente del 90% al 95% y más preferiblemente al menos aproximadamente del 98% al 99,5% de los nucleótidos. Como alternativa, existe una homología sustancial cuando los segmentos hibridan en condiciones de

hibridación selectivas con la complementaria de la cadena. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está “aislado” o se ha hecho “sustancialmente puro” cuando se ha purificado de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, por técnicas convencionales incluyendo tratamiento alcalino/SDS, separación en bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase, F. Ausubel, *et al.*, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York (1987).

Las composiciones de ácido nucleico de la presente invención, aunque con frecuencia están en una secuencia nativa (excepto para sitios de restricción modificados y similares), pueden mutarse a partir de ADNc, genómico o mezclas de los mismos de acuerdo con técnicas convencionales para proporcionar secuencias génicas. En caso de secuencias codificantes, estas mutaciones pueden afectar a la secuencia de aminoácidos según se desee. En particular, se contemplan secuencias de ADN sustancialmente homólogas a o derivadas de secuencias V, D, J nativas, constantes, de cambio y otras secuencias de este tipo descritas en la presente memoria (donde “derivadas” indica que una secuencia es idéntica o está modificada a partir de otra secuencia).

Un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia. Con respecto a las secuencias reguladoras de la transcripción, unido operativamente significa que las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteína, contiguas y en fase de lectura. En caso de secuencias de cambio, unido operativamente indica que las secuencias son capaces de efectuar la recombinación de cambio.

Animales Transgénicos No Humanos Capaces de Producir Anticuerpos Heterólogos

El diseño de un animal transgénico no humano que responde a estimulación con antígenos extraños con un repertorio de anticuerpos heterólogos, requiere que los transgenes de inmunoglobulina heterólogos contenidos dentro del animal transgénico funcionen correctamente a lo largo de la ruta de desarrollo de células B. En una realización preferida, la función correcta de un transgén de cadena pesada heterólogo incluye cambio de isotipo. Por consiguiente, los transgenes de la invención se construyen de modo que produzcan cambio de isotipo y uno o más de los siguientes: (1) expresión específica de tipo celular y de alto nivel, (2) reorganización funcional de genes, (3) activación de y respuesta a exclusión alélica, (4) expresión de un repertorio primario suficiente, (5) transducción de señales, (6) hipermutación somática y (7) dominación del locus de anticuerpo transgénico durante la respuesta inmune.

Como será evidente a partir de la descripción siguiente, no tienen que cumplirse todos los criterios anteriores. Por ejemplo, en las realizaciones en las que los loci de inmunoglobulina endógenos del animal transgénico están funcionalmente interrumpidos, el transgén no tiene que activar la exclusión alélica. Además, en las realizaciones en las que el transgén comprende un gen de inmunoglobulina de cadena ligera y/o pesada funcionalmente reorganizado, no es necesario el segundo criterio de reorganización de genes funcionales, al menos para ese transgén que ya está reorganizado. Como antecedentes sobre inmunología molecular, véase, Fundamental Immunology, 2ª edición (1989), Paul William E., ed. Raven Press, N.Y., que se incorpora en la presente memoria como referencia.

En un aspecto de la invención, se proporcionan animales transgénicos no humanos que contienen transgenes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina heterólogos reorganizados, no reorganizados o una combinación de reorganizados y no reorganizados en la línea germinal del animal transgénico. Cada uno de los transgenes de cadena pesada comprende al menos un gen C_H . Además, el transgén de cadena pesada puede contener secuencias de cambio de isotipo funcionales que sean capaces de servir de soporte al cambio de isotipo de un transgén heterólogo que codifica múltiples genes C_H en células B del animal transgénico. Dichas secuencias de cambio pueden ser las que aparecen de forma natural en el locus de inmunoglobulina de la línea germinal de la especie que sirve como fuente de los genes C_H transgénicos, o dichas secuencias de cambio pueden proceder de las que aparecen en la especie que va a recibir la construcción transgénica (el animal transgénico). Por ejemplo, una construcción transgénica humana que se usa para producir un ratón transgénico puede producir una mayor frecuencia de acontecimientos de cambio de isotipo si incorpora secuencias de cambio similares a las que aparecen de forma natural en el locus de cadena pesada de ratón, ya que presumiblemente las secuencias de cambio de ratón se optimizan para funcionar con el sistema enzimático de recombinasa de cambio de ratón, mientras que las secuencias de cambio humanas no. Pueden aislarse y clonarse secuencias de cambio por métodos de clonación convencionales o pueden sintetizarse *de novo* a partir de oligonucleótidos sintéticos solapantes diseñados basándose en la información de secuencia publicada en relación con secuencias de región de cambio de inmunoglobulina (Mills *et al.*, Nucl. Acids Res. 18:7305-7316 (1991); Sideras *et al.*, Intl. Immunol. 1:631-642 (1989), que se incorporan en la presente memoria como referencia).

Para cada uno de los animales transgénicos anteriores, se encuentran transgenes de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada heterólogos funcionalmente reorganizados en una fracción significativa de las células B del animal transgénico (al menos 10 por ciento).

Los transgenes de la invención incluyen un transgén de cadena pesada que comprende un ADN que codifica al menos un segmento génico variable, un segmento génico de diversidad, un segmento génico de unión y al menos un segmento génico de región constante. El transgén de cadena ligera de inmunoglobulina comprende ADN que codifica al menos un segmento génico variable, un segmento génico de unión y al menos un segmento génico de región

constante. Los segmentos génicos que codifican los segmentos génicos de cadena pesada y ligera son heterólogos al animal transgénico no humano en el sentido de que proceden de o se corresponden con ADN que codifica segmentos génicos de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina de una especie que no consiste en el animal transgénico no humano. En un aspecto de la invención, el transgén se construye de modo que los segmentos génicos individuales no están reorganizados, es decir, no están reorganizados de modo que codifican una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina funcional. Dichos transgenes no reorganizados sirven de soporte a la recombinación de los segmentos génicos V, D y J (reorganización funcional) y preferiblemente sirven de soporte a la incorporación de todo o una porción de un segmento génico de región D en la cadena pesada de inmunoglobulina reorganizada resultante dentro del animal transgénico no humano cuando se expone a antígeno.

En una realización alternativa, los transgenes comprenden un “mini-locus” no reorganizado. Dichos transgenes comprenden típicamente una porción sustancial de los segmentos C, D y J así como un subconjunto de los segmentos génicos V. En dichas construcciones transgénicas, las diversas secuencias reguladoras, por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones de cambio de clase, secuencias donantes de corte y empalme y aceptores de corte y empalme para procesamiento de ARN, señales de recombinación y similares, comprenden secuencias correspondientes derivadas del ADN heterólogo. Dichas secuencias reguladoras pueden incorporarse en el transgén de la misma especie o de una especie relacionada del animal no humano usado en la invención. Por ejemplo, pueden combinarse segmentos génicos de inmunoglobulina humana en un transgén con una secuencia potenciadora de inmunoglobulina de roedor para su uso en un ratón transgénico. Como alternativa, pueden incorporarse secuencias reguladoras sintéticas en el transgén, donde dichas secuencias reguladoras sintéticas no son homólogas a una secuencia de ADN funcional que se sabe que aparece de forma natural en los genomas de mamíferos. Las secuencias reguladoras sintéticas están diseñadas de acuerdo con normas de consenso tales como, por ejemplo, las que especifican las secuencias permisibles de un sitio aceptor de corte y empalme o un motivo promotor/potenciador. Por ejemplo, un minilocus comprende una porción del locus de inmunoglobulina genómico que tiene al menos una delección interna (es decir, no en un extremo terminal de la porción) de una porción de ADN no esencial (por ejemplo, secuencia intermedia; intrón o porción del mismo) en comparación con el locus de Ig de la línea germinal de origen natural.

La invención también incluye animales transgénicos que contienen células de la línea germinal que tienen un transgén de cadena ligera y pesada en los que uno de dichos transgenes contiene segmentos génicos reorganizados, conteniendo el otro segmentos génicos no reorganizados. En las realizaciones preferidas, el transgén reorganizado es un transgén de inmunoglobulina de cadena ligera y el transgén reorganizado es un transgén de inmunoglobulina de cadena pesada.

35 *La Estructura y Generación de Anticuerpos*

La estructura básica de todas las inmunoglobulinas se basa en una unidad que consiste en dos cadenas polipeptídicas ligeras y dos cadenas polipeptídicas pesadas. Cada cadena ligera comprende dos regiones conocidas como la región de cadena ligera variable y la región de cadena ligera constante. De forma similar, la cadena pesada de inmunoglobulina comprende dos regiones denominadas la región de cadena pesada variable y la región de cadena pesada constante.

La región constante para la cadena pesada o ligera está codificada por secuencias genómicas denominadas segmentos génicos de región constante pesada o ligera (C_H). El uso de un segmento génico de cadena pesada particular define la clase de inmunoglobulina. Por ejemplo, en seres humanos, los segmentos génicos de región constante μ definen la clase IgM de anticuerpo mientras que el uso de un segmento génico de región constante γ , γ_2 , γ_3 o γ_4 define la clase IgG de anticuerpos así como las subclases de IgG de IgG1 a IgG4. De forma similar, el uso de un segmento génico de región constante de α_1 o α_2 define la clase IgA de anticuerpos así como las subclases IgA1 e IgA2. Los segmentos génicos de región constante δ y ϵ definen las clases de anticuerpos IgD e IgE respectivamente.

Las regiones variables de las cadenas de inmunoglobulina ligera y pesada contienen en conjunto el dominio de unión a antígeno del anticuerpo. Debido a la necesidad de diversidad en esta región del anticuerpo para permitir la unión a una amplia serie de antígenos, el ADN que codifica la región variable de repertorio primario o inicial comprende varios segmentos de ADN diferentes derivados de familias de segmentos génicos de región variable específicos. En el caso de la región variable de cadena ligera, dichas familias comprenden segmentos génicos variables (V) y segmentos génicos de unión (J). Por lo tanto, la región variable inicial de la cadena ligera está codificada por un segmento génico V y un segmento génico J, cada uno seleccionado de la familia de segmentos génicos V y J contenidos en el ADN genómico del organismo. En el caso de la región variable de cadena pesada, el ADN que codifica la región variable del repertorio primario o inicial de la cadena pesada comprende un segmento génico V de cadena pesada, un segmento génico de diversidad (D) de cadena pesada, y un segmento génico J, cada uno seleccionado de las familias V, D y J apropiadas de segmentos génicos de inmunoglobulina en el ADN genómico.

Para aumentar la diversidad de secuencias que contribuyen a formar sitios de unión a anticuerpo, es preferible que un transgén de cadena pesada incluya secuencias que actúan en cis que sirvan de soporte a la reorganización V-D-J funcional que puede incorporar todo o parte de una secuencia génica de región D en una secuencia génica V-D-J reorganizada. Típicamente, al menos aproximadamente el 1 por ciento de las cadenas pesadas codificadas por transgén expresadas (o ARNm) incluyen secuencias de región D reconocibles en la región V. Preferiblemente, al menos aproximadamente el 10 por ciento de las regiones V codificadas por transgén incluyen secuencias de región D

ES 2 345 580 T3

reconocibles, más preferiblemente al menos aproximadamente el 30 por ciento y más preferiblemente más del 50 por ciento incluyen secuencias de región D reconocibles.

Una secuencia de región D reconocible es generalmente de al menos aproximadamente ocho nucleótidos consecutivos que se corresponden con una secuencia presente en un segmento génico de región D de un transgén de cadena pesada y/o la secuencia de aminoácidos codificada por dicha secuencia de nucleótidos de región D. Por ejemplo, si un transgén incluye el gen de región D DHQ52, un ARNm codificado por transgén que contiene la secuencia 5'-TAACTGGG-3' localizada en la región V entre una secuencia de segmento génico V y una secuencia de segmento génico J es reconocible como un ARNm que contiene una secuencia de región D, específicamente una secuencia DHQ52. De forma similar, por ejemplo, si un transgén incluye el gen de región D DHQ52, un polipéptido de cadena pesada codificado por transgén que contiene la secuencia de aminoácidos -DAF- localizada en la región V entre una secuencia de aminoácidos de segmento génico V y una secuencia de aminoácidos de segmento génico J puede reconocerse como un polipéptido que contiene una secuencia de región D, específicamente una secuencia DHQ52. Sin embargo, puesto que pueden incorporarse segmentos de región D en la unión VDJ en diversas medidas y en diversas fases de lectura, es necesaria una comparación del área de región D de una región variable de cadena pesada con los segmentos de región D presentes en el transgén para determinar la incorporación de segmentos D particulares. Además, la digestión con exonucleasa potencial durante la recombinación puede conducir a uniones V-D y D-J imprecisas durante la recombinación V-D-J.

Sin embargo, debido a la mutación somática y a la adición de región N, algunas secuencias de región D pueden ser reconocibles pero pueden no corresponder de manera idéntica con una secuencia de región D consecutiva en el transgén. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos 5'-CTAAXTG GGG-3' (SEC ID N°: 1), en la que X es A, T o G y que se localiza en una región V de cadena pesada y flanqueada por una secuencia génica de región V y una secuencia génica de región J puede reconocerse como correspondiente a la secuencia DHQ52 5'-CTAAXTG GGG-3'. De forma similar, por ejemplo, las secuencias polipeptídicas -DAFDI- (SEC ID N°: 2), -DYFDY- (SEC ID N°: 3) o -GAFDI- (SEC ID N°: 4) localizadas en una región V y flanqueadas en el lado amino terminal por una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia génica V de transgén y flanqueadas en el lado carboxi terminal por una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia génica J de transgén son reconocibles como una secuencia de región D.

Por lo tanto, como la mutación somática y la adición de región N pueden producir mutaciones en secuencias derivadas de una región D de transgén, se proporciona la definición siguiente como guía para determinar la presencia de una secuencia de región D reconocible. Una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos es reconocible como secuencia de región D si: (1) la secuencia se localiza en una región V y está flanqueada en un lado por una secuencia génica V (secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos deducida) y en el otro lado por una secuencia génica J (secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos deducida) y (2) la secuencia es sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una secuencia génica D conocida (secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos codificada).

La expresión "identidad sustancial", como se usa en la presente memoria, denota una característica de una secuencia polipeptídica o secuencia de ácido nucleico donde la secuencia polipeptídica tiene una identidad de secuencia de al menos el 50 por ciento en comparación con una secuencia de referencia, con frecuencia una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 80% y a veces una identidad de secuencia de más de aproximadamente el 90%, y la secuencia de ácido nucleico tiene una identidad de secuencia de al menos el 70 por ciento en comparación con una secuencia de referencia. El porcentaje de identidad de secuencia se calcula excluyendo delecciones o adiciones pequeñas que suman un total de menos del 35 por ciento de la secuencia de referencia. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia de mayor tamaño, tal como un gen D completo; sin embargo, la secuencia de referencia tiene una longitud de al menos 8 nucleótidos en el caso de polinucleótidos y al menos 3 restos amino de longitud en el caso de un polipéptido. Típicamente, la secuencia de referencia tiene al menos de 8 a 12 nucleótidos o al menos de 3 a 4 aminoácidos, y preferiblemente la secuencia de referencia es de 12 a 15 nucleótidos o más o al menos de 5 aminoácidos.

La expresión "similitud sustancial" denota una característica de una secuencia polipeptídica, donde la secuencia polipeptídica tiene una similitud de al menos el 80 por ciento con una secuencia de referencia. El porcentaje de similitud de secuencia se calcula puntuando aminoácidos idénticos o sustituciones conservativas de posiciones de aminoácidos como similares. Una sustitución conservativa de posición de aminoácido es una que puede ser el resultado de una sustitución de un solo nucleótido; un primer aminoácido se sustituye por un segundo aminoácido en el que un codón del primer aminoácido y un codón del segundo aminoácido pueden diferir por la sustitución de un solo nucleótido. Por lo tanto, por ejemplo, la secuencia -Lys-Glu-Arg-Val- (SEC ID N°: 5) es sustancialmente similar a la secuencia -Asn-Asp-Ser-Val- (SEC ID N°: 6), puesto que la secuencia de codones -AAA-GAA-AGA-GUU- (SEC ID N°: 7) puede mutarse a -AAC-GAC-AGC-GUU- (SEC ID N°: 8) introduciendo sólo 3 mutaciones de sustitución, sustituciones de un solo nucleótido en tres de los cuatro codones originales. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia de mayor tamaño, tal como un gen D completo; sin embargo, la secuencia de referencia tiene al menos 4 restos amino de longitud. Típicamente, la secuencia de referencia es de al menos 5 aminoácidos y preferiblemente la secuencia de referencia es de 6 aminoácidos o más.

El Repertorio Primario

El proceso para generar ADN que codifica los genes de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada se produce principalmente en células B en desarrollo. Antes de la unión de diversos segmentos génicos de inmunoglobulina, los segmentos génicos V, D, J y constante (C) se encuentran, en su mayor parte, en grupos de segmentos génicos V, D, J y C en los precursores de células B de repertorio primario. Generalmente, todos los segmentos génicos para una cadena ligera o pesada se localizan en relativamente estrecha proximidad en un solo cromosoma. Dicho ADN genómico antes de la recombinación de los diversos segmentos génicos de inmunoglobulina se denomina en la presente memoria ADN genómico “no reorganizado”. Durante la diferenciación de células B, uno de cada uno de los miembros de familia apropiados de los segmentos génicos V, D, J (o sólo V y J en el caso de genes de cadena ligera) se recombina para formar genes de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada funcionalmente reorganizados. Dicha reorganización funcional es de los segmentos de región variable para formar ADN que codifica una región variable funcional. Este proceso de reorganización de segmento génico parece ser secuencial. En primer lugar, se generan uniones D a J de la cadena pesada, seguidas de uniones V a DJ de la cadena pesada y uniones V a J de la cadena ligera. El ADN que codifica la forma inicial de una región variable funcional en una cadena ligera y/o pesada se denomina “ADN funcionalmente reorganizado” o “ADN reorganizado”. En el caso de la cadena pesada, dicho ADN se denomina “ADN de cadena pesada reorganizado” y en el caso de la cadena ligera, dicho ADN se denomina “ADN de cadena ligera reorganizado”. Se usa un lenguaje similar para describir la reorganización funcional de los transgenes de la invención.

La recombinación de segmentos génicos de región variable para formar regiones variables de cadena ligera y pesada funcionales está mediada por secuencias señal de recombinación (RSS) que flanquean segmentos V, D y J recombinatoriamente competentes. Las RSS necesarias y suficientes para dirigir la recombinación comprenden un heptámero con simetría diada, un nonámero rico en AT y una región espaciadora intermedia de 12 ó 23 pares de bases. Estas señales están conservadas entre los diferentes loci y especies que llevan a cabo la recombinación D-J (o V-J) y son funcionalmente intercambiables. Véase Oettinger, *et al.* (1990), *Science*, 248,1517-1523 y referencias citadas en la misma. El heptámero comprende la secuencia CACAGTG o su análogo seguido de un espaciador de secuencia no conservada y después un nonámero que tiene la secuencia ACAAAAACC o su análogo. Estas secuencias se encuentran en el segmento génico J, o en el lado de cadena abajo de cada uno de los segmentos génicos V y D. Precediendo inmediatamente a los segmentos D y J de la línea germinal hay de nuevo dos secuencias señal de recombinación, primero el nonámero y después el heptámero de nuevo separados por una secuencia no conservada. Las secuencias heptamérica y nonamérica después de un segmento V_L, V_H o D son complementarias a las que preceden a los segmentos J_L, D o J_H anteriores con los que se recombinan. Los espaciadores entre las secuencias heptaméricas y nonaméricas son de 12 pares de bases de longitud o de entre 22 y 24 pares de bases de longitud.

Además de la reorganización de los segmentos V, D y J, se genera una diversidad adicional en el repertorio primario de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina por medio de recombinación variable entre los segmentos V y J en la cadena ligera y entre los segmentos D y J de la cadena pesada. Dicha recombinación variable se genera por variación en el lugar exacto en el que se unen dichos segmentos. Dicha variación en la cadena ligera se produce típicamente dentro del último codón del segmento génico V y del primer codón del segmento J. Se produce una imprecisión similar en la unión en el cromosoma de cadena pesada entre los segmentos D y J_H y puede prolongarse a lo largo de hasta 10 nucleótidos. Además, pueden insertarse varios nucleótidos entre D y J_H y entre los segmentos génicos V_H y D que no están codificados por ADN genómico. La adición de estos nucleótidos se conoce como diversidad de región N.

Después de la reorganización de VJ y/o VDJ, la transcripción de la región variable reorganizada y uno o más segmentos génicos de la región constante localizados cadena abajo de la región variable reorganizada produce un transcrito de ARN primario que tras un corte y empalme de ARN apropiado da como resultado un ARNm que codifica una cadena de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada de longitud completa. Dichas cadenas ligera y pesada incluyen una secuencia señal líder para efectuar la secreción por y/o la inserción de la inmunoglobulina en la región transmembrana de la célula B. El ADN que codifica esta secuencia señal está contenido dentro del primer exón del segmento V usado para formar la región variable de la cadena de inmunoglobulina ligera o pesada. También están presentes secuencias reguladoras apropiadas en el ARNm para controlar la traducción del ARNm para producir los polipéptidos de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada codificados que tras una asociación apropiada entre sí forman una molécula de anticuerpo.

El efecto neto de dichas reorganizaciones en los segmentos génicos de la región variable y la recombinación variable que puede producirse durante dicha unión es la producción de un repertorio de anticuerpos primarios. Generalmente, cada célula B que se ha diferenciado hasta esta fase, produce un solo repertorio de anticuerpos primarios. Durante este proceso de diferenciación se producen acontecimientos celulares que suprimen la reorganización funcional de segmentos génicos distintos de los contenidos dentro del gen de Ig funcionalmente reorganizado. El proceso por el que células B diploides mantienen dicha mono-especificidad se denomina exclusión alélica.

El Repertorio Secundario

Clones de células B que expresan inmunoglobulinas del conjunto de secuencias que comprenden el repertorio primario están inmediatamente disponibles para responder a antígenos extraños. Debido a la diversidad limitada generada por unión simple de VJ y VDJ, los anticuerpos producidos por la denominada respuesta primaria son de relativamente

baja afinidad. Dos tipos diferentes de células B componen esta respuesta inicial: precursores de células formadoras de anticuerpos primarios y precursores de células B de repertorio secundario (Linton *et al.*, Cell 59: 1049-1059 (1989)). El primer tipo de células B madura en células plasmáticas secretoras de IgM en respuesta a ciertos antígenos. Las otras células B responden a una exposición inicial a antígeno al entrar en una ruta de maduración dependiente de células T.

Durante la maduración dependiente de células T de clones de células B estimulados por antígeno, la estructura de la molécula de anticuerpo en la superficie celular cambia de dos formas: la región constante cambia a un subtipo no IgM y la secuencia de la región variable puede modificarse por múltiples sustituciones de un solo aminoácido para producir una molécula de anticuerpo de mayor afinidad.

Como se ha indicado anteriormente, cada región variable de una cadena de Ig pesada o ligera contiene un dominio de unión a antígeno. Se ha determinado por secuenciación de ácidos nucleicos y aminoácidos que se produce mutación somática durante la respuesta secundaria por toda la región V incluyendo las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) también denominadas regiones hipervariables 1, 2 y 3 (Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest (1991) U.S. Department of Health and Human Services, Washington, DC, incorporada en la presente memoria como referencia. La CDR1 y la CDR2 se localizan dentro del segmento génico variable, mientras que la CDR3 es en su mayor parte el resultado de la recombinación entre segmentos génicos V y J o segmentos génicos V, D y J. Esas porciones de la región variable que no consisten en CDR1, 2 ó 3 se denominan comúnmente regiones flanqueantes designadas FR1, FR2, FR3 y FR4. Véase la Figura 1. Durante la hipermutación, el ADN reorganizado se muta para dar origen a nuevos clones con moléculas de Ig alteradas. Esos clones con mayores afinidades por el antígeno extraño se expanden selectivamente por células T auxiliares dando origen a maduración por afinidad del anticuerpo expresado. La selección clonal da como resultado típicamente la expresión de clones que contienen una nueva mutación dentro de las regiones CDR1, 2 y/o 3. Sin embargo, también se producen mutaciones fuera de estas regiones que influyen en la especificidad y afinidad del dominio de unión a antígeno.

Animales Transgénicos No Humanos Capaces de Producir Anticuerpo Heterólogo

Los animales transgénicos no humanos en un aspecto de la invención se producen introduciendo al menos uno de los transgenes de inmunoglobulina de la invención (analizado a continuación en la presente memoria) en un cigoto o embrión temprano de un animal no humano. Los animales no humanos que se usan en la invención comprenden generalmente cualquier mamífero que sea capaz de reorganizar segmentos génicos de inmunoglobulina para producir una respuesta de anticuerpos primarios. Dichos animales transgénicos no humanos pueden incluir, por ejemplo, cerdos transgénicos, ratas transgénicas, conejos transgénicos, ganado transgénico y otras especies animales transgénicas, particularmente especies de mamífero conocidas en la técnica. Un animal no humano particularmente preferido es el ratón u otros miembros de la familia de roedores.

Sin embargo, la invención no se limita al uso de ratones. En su lugar, puede usarse cualquier mamífero no humano que sea capaz de montar una respuesta de anticuerpos primarios y secundarios. Dichos animales incluyen primates no humanos, tales como chimpancés, especies bovinas, ovinas y porcinas, otros miembros de la familia de roedores, por ejemplo, rata, así como conejo y cobaya. Son animales particularmente preferidos ratón, rata, conejo y cobaya, más preferiblemente ratón.

En una realización de la invención, se usan diversos segmentos génicos del genoma humano en transgenes de cadena pesada y ligera en una forma no reorganizada. En esta realización, dichos transgenes se introducen en ratones. Los segmentos génicos no reorganizados del transgén de cadena pesada y/o ligera tienen secuencias de ADN únicas para la especie humana que son diferenciables de los segmentos génicos de inmunoglobulina endógena en el genoma de ratón. Pueden detectarse fácilmente en forma no reorganizada en la línea germinal y células somáticas que no consisten en células B y en forma reorganizada en células B.

En una realización alternativa de la invención, los transgenes comprenden transgenes de inmunoglobulina de cadena ligera y/o pesada reorganizados. Los segmentos específicos de dichos transgenes correspondientes a segmentos VDJ o VJ funcionalmente reorganizados contienen secuencias de ADN de inmunoglobulina que también son claramente distinguibles de los segmentos génicos de inmunoglobulina endógenos en el ratón.

Dichas diferencias en la secuencia de ADN también se reflejan en la secuencia de aminoácidos codificada por dichos transgenes de inmunoglobulina humana en comparación con los codificados por células B de ratón. Por lo tanto, pueden detectarse secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina humana en los animales transgénicos no humanos de la invención con anticuerpos específicos para epítomos de inmunoglobulina codificados por segmentos génicos de inmunoglobulina humana.

Las células B transgénicas que contienen transgenes no reorganizados de ser humano u otras especies recombinan funcionalmente los segmentos génicos apropiados para formar regiones variables de cadena pesada y ligera funcionalmente reorganizadas. Será fácilmente evidente que el anticuerpo codificado por dichos transgenes reorganizados tiene una secuencia de ADN y/o aminoácidos que es heteróloga a la que se encuentra normalmente en el animal no humano usado para la práctica de la invención.

Transgenes no Reorganizados

Como se usa en la presente memoria, un “transgén de cadena pesada de inmunoglobulina no reorganizado” comprende un ADN que codifica al menos un segmento génico variable, un segmento génico de diversidad, un segmento génico de unión y un segmento génico de región constante. Cada uno de los segmentos génicos de dicho transgén de cadena pesada procede de o tiene una secuencia correspondiente a un ADN que codifica segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina de una especie que no consiste en el animal no humano en el que se introduce dicho transgén. De forma similar, como se usa en la presente memoria, un “transgén de cadena ligera de inmunoglobulina no reorganizado” comprende un ADN que codifica al menos un segmento génico variable, un segmento génico de unión y al menos un segmento génico de región constante en el que cada segmento génico de dicho transgén de cadena ligera procede de o tiene una secuencia correspondiente a un ADN que codifica segmentos génicos de cadena ligera de inmunoglobulina de una especie que no consiste en el animal no humano en el que se introduce dicho transgén de cadena ligera.

Dichos transgenes de cadena ligera y pesada en este aspecto de la invención contienen los segmentos génicos identificados anteriormente en una forma no reorganizada. Por lo tanto, interpuesto entre los segmentos V, D y J en el transgén de cadena pesada y entre los segmentos V y J en el transgén de cadena ligera hay secuencias señal de recombinación apropiadas (RSS). Además, dichos transgenes también incluyen señales de corte y empalme de ARN apropiadas para unir un segmento génico de región constante con la región variable reorganizada VJ o VDJ.

Para facilitar el cambio de isotipo dentro de un transgén de cadena pesada que contiene más de un segmento génico de región C, por ejemplo, $C\mu$ y $C\gamma 1$ del genoma humano, como se explica a continuación, se incorporan “regiones de cambio” cadena arriba de cada uno de los segmentos génicos de región constante y cadena abajo de los segmentos génicos de región variable para permitir la recombinación entre dichas regiones constantes para proporcionar el cambio de clase de la inmunoglobulina, por ejemplo, de IgM a IgG. Dichos transgenes de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada también contienen secuencias de control de la transcripción incluyendo regiones promotoras situadas cadena arriba de los segmentos génicos de región variable que contienen típicamente motivos TATA. Una región promotora puede definirse aproximadamente como una secuencia de ADN que, cuando se une operativamente a una secuencia cadena abajo, puede producir la transcripción de la secuencia cadena abajo. Los promotores pueden requerir la presencia de secuencias que actúan en cis unidas adicionales para producir una transcripción eficaz. Además, preferiblemente se incluyen otras secuencias que participan en la transcripción de transcritos estériles. Pueden encontrarse ejemplos de secuencias que participan en la expresión de transcritos estériles en la bibliografía publicada, incluyendo Rothman *et al.*, Intl. Immunol. 2: 621-627(1990); Reid *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 840-844 (1989); Stavnezer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7704-7708 (1988); y Mills *et al.*, Nucl. Acids Res. 18: 7305-7316 (1991), incorporándose cada una de ellas en la presente memoria como referencia. Estas secuencias incluyen típicamente aproximadamente al menos 50 pb inmediatamente cadena arriba de una región de cambio, preferiblemente aproximadamente 200 pb cadena arriba de una región de cambio; y más preferiblemente aproximadamente al menos 200-1000 pb o más cadena arriba de una región de cambio. Aparecen secuencias adecuadas inmediatamente cadena arriba de las regiones de cambio $S_{\gamma 1}$, $S_{\gamma 2}$, $S_{\gamma 3}$, $S_{\gamma 4}$, $S_{\alpha 1}$, $S_{\alpha 2}$ y S_{ϵ} humanas; las secuencias inmediatamente cadena arriba de las regiones de cambio $S_{\gamma 1}$ y $S_{\gamma 3}$ humanas pueden usarse ventajosamente, prefiriéndose generalmente $S_{\gamma 1}$. Como alternativa o en combinación, pueden usarse secuencias de cambio de Ig murina; frecuentemente puede ser ventajoso emplear secuencias de cambio de Ig de la misma especie que el animal no humano transgénico. Además, se incluyen preferiblemente elementos reguladores de la transcripción inducibles por interferón (IFN), tales como potenciadores inducibles por IFN, inmediatamente cadena arriba de las secuencias de cambio de transgén.

Además de promotores, se usan otras secuencias reguladoras que funcionan principalmente en células de linaje B. Por lo tanto, por ejemplo, se usa una secuencia potenciadora de cadena ligera situada preferiblemente entre los segmentos génicos de región constante y J en el transgén de cadena ligera para potenciar la expresión del transgén, facilitando de este modo la exclusión alélica. En el caso del transgén de cadena pesada, también se emplean potenciadores reguladores. Dichas secuencias reguladoras se usan para maximizar la transcripción y traducción del transgén de modo que se induzca exclusión alélica y para proporcionar niveles relativamente altos de expresión del transgén.

Aunque el promotor anterior y las secuencias de control reguladoras potenciadoras se han descrito genéricamente, dichas secuencias reguladoras pueden ser heterólogas para el animal no humano que procede del ADN genómico del que se obtienen segmentos génicos de inmunoglobulina de transgén heterólogo. Como alternativa, dichos segmentos génicos reguladores proceden de las secuencias reguladoras correspondientes en el genoma del animal no humano, o especies estrechamente relacionadas, que contienen el transgén de cadena ligera y pesada.

En las realizaciones preferidas, los segmentos génicos proceden de seres humanos. Los animales transgénicos no humanos que albergan dichos transgenes de cadena pesada y ligera son capaces de montar una respuesta inmune mediada por Ig contra un antígeno específico administrado a dicho animal. Dentro de dicho animal se producen células B que son capaces de producir un anticuerpo humano heterólogo. Después de la inmortalización y de la selección de un anticuerpo monoclonal apropiado (Mab), por ejemplo, un hibridoma, se proporciona una fuente de anticuerpo monoclonal humano terapéutico. Dichos Mab humanos tienen una inmunogenicidad significativamente reducida cuando se administran terapéuticamente a seres humanos.

Aunque las realizaciones preferidas describen la construcción de transgenes de cadena ligera y pesada que contienen segmentos génicos humanos, la invención no está limitada a esto. A este respecto, se entenderá que los contenidos

descritos en la presente memoria pueden adaptarse fácilmente para utilizar segmentos génicos de inmunoglobulina de una especie distinta de seres humanos. Por ejemplo, además del tratamiento terapéutico de seres humanos con los anticuerpos de la invención, pueden utilizarse anticuerpos terapéuticos codificados por segmentos génicos apropiados para generar anticuerpos monoclonales para su uso en las ciencias veterinarias.

5

Transgenes Reorganizados

En una realización alternativa, los animales transgénicos no humanos contienen funcionalmente al menos un transgén de inmunoglobulina de cadena pesada heterólogo reorganizado en la línea germinal del animal transgénico. Dichos animales contienen células B de repertorio primario que expresan dichos transgenes de cadena pesada reorganizados. Dichas células B preferiblemente son capaces de experimentar una mutación somática cuando se ponen en contacto con un antígeno para formar un anticuerpo heterólogo que tiene alta afinidad y especificidad por el antígeno. Dichos transgenes reorganizados contendrán al menos dos genes C_H y las secuencias asociadas necesarias para el cambio de isotipo.

15

La invención también incluye animales transgénicos que contienen células de la línea germinal que tienen transgenes de cadena ligera y pesada en los que uno de dichos transgenes contiene segmentos génicos reorganizados conteniendo el otro segmentos génicos no reorganizados. En dichos animales, los transgenes de cadena pesada tendrán al menos dos genes C_H y las secuencias asociadas necesarias para el cambio de isotipo.

20

La invención incluye además métodos para generar un repertorio de segmentos génicos de región variable sintéticos a usar en los transgenes de la invención. El método comprende generar una población de ADN de segmento V de inmunoglobulina en la que cada uno de los ADN de segmento V codifica un segmento V de inmunoglobulina y contiene en cada extremo un sitio de reconocimiento de escisión de una endonucleasa de restricción. La población de ADN de segmento V de inmunoglobulina se concatena después de eso para formar el repertorio de segmentos V de inmunoglobulina sintéticos. Dichos transgenes de cadena pesada de región variable sintéticos tendrán al menos dos genes C_H y las secuencias asociadas necesarias para el cambio de isotipo.

25

Cambio de Isotipo

30

En el desarrollo de un linfocito B, la célula inicialmente produce IgM con una especificidad de unión determinada por las regiones V_H y V_L productivamente reorganizadas. Posteriormente, cada célula B y sus células descendientes sintetizan anticuerpos con las mismas regiones V de cadena L y H, pero pueden cambiar el isotipo de la cadena H.

35

El uso de regiones constantes μ o δ se determina en gran parte por corte y empalme alternativo, permitiendo que se co-expresen en una sola célula IgM e IgD. Los otros isotipos de cadena pesada (γ , α y ϵ) se expresan solamente de forma nativa después de que un acontecimiento de reorganización génica deleccione los exones C_μ y C_δ . Este proceso de reorganización génica, denominado cambio de isotipo, se produce típicamente por recombinación entre los denominados segmentos de cambio localizados inmediatamente cadena arriba de cada gen de cadena pesada (excepto δ). Los segmentos de cambio individuales son de entre 2 y 10 kb de longitud y consisten principalmente en secuencias repetidas cortas. Para los acontecimientos de cambio de clase individuales difiere el punto exacto de recombinación. Las investigaciones que han usado cinética de hibridación en solución o transferencia de Southern con sondas de C_H derivadas de ADNc han confirmado que el cambio puede estar asociado con pérdida de secuencias C_H de la célula.

40

La región de cambio (S) del gen μ , S_μ , se localiza aproximadamente en 1 a 2 kb en posición 5' con respecto a la secuencia codificante y está compuesta por numerosas repeticiones en tándem de secuencias de la forma $(GAGCT)_n$ (GGGGT) (SEC ID N°: 9-24), donde n es habitualmente de 2 a 5 pero puede variar hasta 17. (Véase T. Nikaído *et al.* Nature 292:845-848 (1981)).

45

Se han descubierto secuencias de cambio repetitivas internamente similares que abarcan varios kilobases en posición 5' con respecto a otros genes C_H . La región S_α se ha secuenciado y se ha descubierto que consiste en unidades de homología de 80 pb repetidas en tándem, mientras que las $S_{\gamma_{2a}}$, $S_{\gamma_{2b}}$ y S_{γ_3} murinas contienen, todas ellas, unidades de homología de 49 pb repetidas muy similares entre sí. (Véase, P. Szurek *et al.*, J. Immunol 135:620-626 (1985) y T. Nikaído *et al.*, J. Biol. Chem. 257:7322-7329 (1982), que se incorporan en la presente memoria como referencia). Todas las regiones S secuenciadas incluyen numerosas apariciones de los pentámeros GAGCT y GGGGT que son los elementos básicos repetidos básicos del gen S_μ (T. Nikaído *et al.*, J. Biol. Chem. 257:7322-7329 (1982), que se incorpora en la presente memoria como referencia); en las otras regiones S, estos pentámeros no están precisamente repetidos en tándem como en S_μ sino que en su lugar están incluidos en unidades de repetición más grandes. La región S_{γ_1} tiene una estructura de orden superior adicional: dos secuencias de repetición directa flanquean cada uno de dos grupos de repeticiones en tándem de 49 pb. (Véase M. R. Mowatt *et al.*, J. Immunol. 136:2674-2683 (1986), que se incorpora en la presente memoria como referencia).

50

Se han descubierto que regiones de cambio de genes de cadena H humana son muy similares a sus homólogos de ratón. De hecho, se ha descubierto que la similitud entre pares de clones de ratón y humanos en posición 5' con respecto a los genes C_H está limitada a las regiones S, un hecho que confirma el significado biológico de estas regiones.

65

Una recombinación de cambio entre genes μ y α produce una secuencia S_μ - S_α compuesta. Típicamente, no existe un sitio específico, ni en S_μ ni en cualquier otra región S, donde se produce siempre la recombinación.

Generalmente, a diferencia de la maquinaria enzimática de la recombinación V-J, aparentemente la máquina de cambio puede alojar diferentes alineamientos de las regiones homólogas repetidas de los precursores S de línea germinal y después unir las secuencias en diferentes posiciones dentro del alineamiento. (Véase, T. H. Rabbitts *et al.*, Nucleic Acids Res. 9:4509-4524 (1981) y J. Ravetch *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6734-6738 (1980), que se incorporan en la presente memoria como referencia).

Se desconocen los detalles exactos del mecanismo (o mecanismos) de activación selectiva de cambio a un isotipo particular. Aunque influencias exógenas tales como linfocinas y citocinas podrían regular positivamente las recombinaciones específicas de isotipo, también es posible que la misma maquinaria enzimática catalice cambios a todos los isotipos y que la especificidad se encuentre en la dirección de esta maquinaria a regiones de cambio específicas.

Se ha demostrado que las linfocinas derivadas de células T IL-4 e IFN γ promueven específicamente la expresión de ciertos isotipos: en el ratón, la IL-4 disminuye la expresión de IgM, IgG2a, IgG2b e IgG3 y aumenta la expresión de IgE e IgG1; mientras que el IFN γ estimula selectivamente la expresión de IgG2a y antagoniza el aumento inducido por IL-4 de la expresión de IgE e IgG1 (Coffman *et al.*, J. Immunol. 136: 949 (1986) y Snapper *et al.*, Science 236: 944 (1987), que se incorporan en la presente memoria como referencia). Una combinación de IL-4 e IL-5 promueve la expresión de IgA (Coffman *et al.*, J. Immunol. 139: 3685 (1987), que se incorpora en la presente memoria como referencia).

La mayoría de los experimentos que implican efectos de células T sobre el cambio no han descartado la posibilidad de que el aumento observado en células con recombinaciones de cambio particulares pueda reflejar la selección de células pre-cambiadas o pre-comprometidas; pero la explicación más probable es que las linfocinas promueven en realidad la recombinación de cambio.

La inducción de cambio de clase parece estar asociada con transcritos estériles que se inician cadena arriba de los segmentos de cambio (Lutzker *et al.*, Mol. Cell. Biol. 8:1849 (1988); Stavnezer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:7704 (1988); Esser y Radbruch, EMBO J. 8:483 (1989); Berton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:2829 (1989); Rothman *et al.* Int. Immunol. 2:621 (1990), cada uno de los cuales se incorpora como referencia). Por ejemplo, la inducción observada del transcrito estéril $\gamma 1$ por IL-4 e inhibición por IFN- γ se correlaciona con la observación de que la IL-4 promueve el cambio de clase a $\gamma 1$ en células B en cultivo, mientras que el IFN- γ inhibe la expresión de $\gamma 1$. Por lo tanto, la inclusión de secuencias reguladoras que afectan a la transcripción de transcritos estériles también puede afectar a la velocidad de cambio de isotipo. Por ejemplo, puede esperarse que el aumento de la transcripción de un transcrito estéril particular típicamente aumente la frecuencia de recombinación de cambio de isotipo que implica secuencias de cambio adyacentes.

Por estas razones, es preferible que los transgenes incorporen secuencias reguladoras de la transcripción dentro de aproximadamente 1-2 kb cadena arriba de cada región de cambio que se va a utilizar para el cambio de isotipo. Estas secuencias reguladoras de la transcripción incluyen preferiblemente un promotor y un elemento potenciador, y más preferiblemente incluyen la región flanqueante 5' (es decir, cadena arriba) que está naturalmente asociada (es decir, aparece en la configuración de la línea germinal) con una región de cambio. Esta región flanqueante 5' es típicamente de aproximadamente al menos 50 nucleótidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente al menos 200 nucleótidos de longitud y más preferiblemente de al menos 500-1000 nucleótidos.

Aunque una secuencia flanqueante 5' de una región de cambio puede unirse operativamente a una región de cambio diferente para la construcción de un transgén (por ejemplo, una secuencia flanqueante 5' del cambio S $_{\gamma 1}$ humano puede injertarse inmediatamente cadena arriba del cambio S $_{\alpha 1}$; una región flanqueante S $_{\gamma 1}$ murina puede injertarse adyacente a una secuencia de cambio $\gamma 1$ humana; o el cambio S $_{\gamma 1}$ murino puede injertarse sobre la región codificante $\gamma 1$ humana), en algunas realizaciones se prefiere que cada región de cambio incorporada en la construcción de transgén tenga la región flanqueante 5' que aparece inmediatamente cadena arriba en la configuración de línea germinal de origen natural.

Anticuerpos Monoclonales

Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales por diversas técnicas con las que estarán familiarizados los expertos en la materia. En resumen, se immortalizan células de bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado, comúnmente por fusión con una célula de mieloma (véase, Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol., 6:511-519 (1976)). Los métodos alternativos de immortalización incluyen la transformación con Virus de Epstein Barr, oncogenes o retrovirus, u otros métodos bien conocidos en la técnica. Las colonias que surgen de células immortalizadas individuales se exploran con respecto a la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseada por el antígeno, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por dichas células puede aumentarse por diversas técnicas, incluyendo inyección en la cavidad peritoneal de un hospedador vertebrado. Se analizan diversas técnicas útiles en estos campos, por ejemplo, en Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York (1988), incluyendo: inmunización de animales para producir inmunoglobulinas; producción de anticuerpos monoclonales; marcaje de inmunoglobulinas para su uso como sondas; purificación de inmutafinidad; e inmunoensayos.

ES 2 345 580 T3

El Repertorio Primario Transgénico

A. Los Loci de Inmunoglobulina Humanos

5 Un requisito importante para la función del transgén es la generación de un repertorio de anticuerpos primarios que sea lo suficientemente diverso para provocar una respuesta inmune secundaria para una amplia variedad de antígenos. El gen de cadena pesada reorganizado consiste en un exón de péptido señal, un exón de región variable y una serie en tándem de regiones de región constante multi-dominio, cada una de las cuales está codificada por varios exones. Cada uno de los genes de región constante codifica la porción constante de una clase diferente de inmunoglobulinas. Durante
10 el desarrollo de células B, se delecionan regiones constantes proximales a la región V que conducen a la expresión de nuevas clases de cadena pesada. Para cada clase de cadena pesada, patrones alternativos de corte y empalme de ARN dan origen tanto a inmunoglobulinas transmembrana como a inmunoglobulinas secretadas.

Se estima que el locus de cadena pesada humano consiste en aproximadamente 200 segmentos génicos V (los
15 datos actuales confirman la existencia de aproximadamente 50-100 segmentos génicos V) que abarcan 2 Mb, aproximadamente 30 segmentos génicos D que abarcan aproximadamente 40 kb, seis segmentos J agrupados dentro de un tramo de 0,3 kb y nueve segmentos génicos de región constante dispersados sobre aproximadamente 300 kb. El locus completo abarca aproximadamente 2,5 Mb de la porción distal del brazo largo del cromosoma 14.

20 B. Transgenes de Fragmento Génico

1. Transgén de Cadena Pesada

En una realización preferida, los transgenes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina comprenden ADN
25 genómico no reorganizado de seres humanos. En el caso de la cadena pesada, un transgén preferido comprende un fragmento NotI que tiene una longitud comprendida entre 670 y 830 kb. La longitud de este fragmento es ambigua porque el sitio de restricción 3' no se ha mapeado con precisión. Se sabe, sin embargo, que reside entre los segmentos génicos $\alpha 1$ y $\Psi\alpha$. Este fragmento contiene miembros de las seis familias de V_H conocidas, los segmentos génicos D y J así como las regiones constantes μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$ y $\alpha 1$ (Berman *et al.*, EMBO J. 7:727-738 (1988), que se incorpora en la presente memoria como referencia). Una línea de ratón transgénico que contiene este transgén expresa correctamente
30 una clase de cadena pesada necesaria para el desarrollo de células B (IgM) y al menos una clase de cadena pesada cambiada (IgG₁) junto con un repertorio suficientemente grande de regiones variables para provocar una respuesta secundaria para la mayoría de los antígenos.

35 2. Transgén de Cadena Ligera

Un fragmento genómico que contiene todos los segmentos génicos necesarios y secuencias reguladoras de un locus de cadena ligera humana puede construirse de forma similar. Dichos transgenes se construyen como se describe en los ejemplos y en la solicitud en trámite junto con la presente titulada "Transgenic Non-Human Animals Capable
40 of Producing Heterologous Antibodies" ("Animales Transgénicos No Humanos Capaces de Producir Anticuerpos Heterólogos"), presentada el 29 de agosto de 1990, de acuerdo con U.S.S.N. 07/574.748.

C. Transgenes Generados Intracelularmente por Recombinación *In Vivo*

45 No es necesario aislar todo o parte del locus de la cadena pesada en un solo fragmento de ADN. Por lo tanto, por ejemplo, el fragmento NotI de 670-830 kb del locus de cadena pesada de inmunoglobulina humana puede formarse *in vivo* en el animal no humano durante la transgénesis. Dicha construcción de transgén *in vivo* se produce introduciendo dos o más fragmentos de ADN solapantes en un núcleo embrionario del animal no humano. Las porciones solapantes de los fragmentos de ADN tienen secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas. Tras la exposición a las
50 recombinasas contenidas dentro de los núcleos embrionarios, los fragmentos de ADN solapantes se recombinaban de forma homóloga en una orientación apropiada para formar el fragmento de cadena pesada NotI de 670-830 kb.

Puede usarse la construcción de transgén *in vivo* para formar cualquier número de transgenes de inmunoglobulina que, debido a su tamaño, son difíciles o imposibles de generar o manipular de otro modo mediante la tecnología
55 actual. Por lo tanto, la construcción de transgenes *in vivo* es útil para generar transgenes de inmunoglobulina que sean de mayor tamaño que los fragmentos de ADN que pueden manipularse por vectores YAC (Murray y Szostak, Nature 305:189-193 (1983)). Dicha construcción de transgén *in vivo* puede usarse para introducir en un animal no humano sustancialmente los loci de inmunoglobulina completos de una especie que no consiste en el animal transgénico no humano.

60 Además de formar transgenes de inmunoglobulina genómicos, también puede utilizarse la recombinación homóloga *in vivo* para formar transgenes de "mini-locus" como se describe en los Ejemplos.

En las realizaciones preferidas que utilizan construcción de transgenes *in vivo*, cada fragmento de ADN solapante
65 tiene preferiblemente una secuencia de ADN solapante sustancialmente homóloga entre la porción terminal de un fragmento de ADN y la porción terminal de un segundo fragmento de ADN. Dichas porciones solapantes de los fragmentos de ADN comprenden preferiblemente de aproximadamente 500 pb a aproximadamente 2000 pb, más preferiblemente de 1,0 kb a 2,0 kb. La recombinación homóloga de fragmentos de ADN solapantes para formar

ES 2 345 580 T3

transgenes *in vivo* se describe adicionalmente en la solicitud de patente de Estados Unidos de cesión común titulada "Intracellular Generation of DNA by Recombination of DNA Fragments" presentada el 29 de agosto de 1990, de acuerdo con U.S.S.N. 07/574.747.

5 D. Transgenes de Minilocus

Como se usa en la presente memoria, la expresión "minilocus de inmunoglobulina" se refiere a una secuencia de ADN (que puede incluirse en una secuencia de mayor tamaño) habitualmente de menos de aproximadamente 150 kb, típicamente de entre aproximadamente 25 y 100 kb, que contiene al menos uno de cada uno de los siguientes: un segmento génico variable (V) funcional, un segmento de región de unión (J) funcional, al menos un segmento génico de región constante (C) funcional y - si es un minilocus de cadena pesada - un segmento de región de diversidad (D) funcional de modo que dicha secuencia de ADN contiene al menos una discontinuidad sustancial (por ejemplo, una delección, habitualmente de al menos aproximadamente 2 a 5 kb, preferiblemente de 10-25 kb o más, respecto a la secuencia de ADN genómico homólogo). Un transgén de minilocus de cadena ligera tendrá una longitud de al menos 25 kb, típicamente de 50 a 60 kb. Un transgén de cadena pesada será típicamente de aproximadamente 70 a 80 kb de longitud, preferiblemente de al menos aproximadamente 60 kb con dos regiones constantes unidas operativamente a regiones de cambio. Además, los elementos individuales del minilocus están preferiblemente en la configuración de línea germinal y son capaces de experimentar reorganización génica en la célula pre-B de un animal transgénico de modo que exprese moléculas de anticuerpo funcionales con diversas especificidades de antígeno codificadas totalmente por los elementos del minilocus. Además, un minilocus de cadena pesada que comprende al menos dos genes C_H y las secuencias de cambio necesarias es típicamente capaz de experimentar cambio de isotipo, de modo que se generarán moléculas de anticuerpo funcionales de diferentes clases de inmunoglobulina. Dicho cambio de isotipo puede suceder *in vivo* en células B que residen dentro del animal no transgénico no humano o puede suceder en células cultivadas del linaje de células B que se han explantado a partir del animal transgénico no humano.

En una realización preferida alternativa, los transgenes de cadena pesada de inmunoglobulina comprenden uno o más de cada uno de los segmentos génicos V_H, D y J_H y dos o más de los genes C_H. Al menos uno de cada segmento génico de tipo apropiado se incorpora en el transgén de minilocus. Con respecto a los segmentos C_H para el transgén de cadena pesada, se prefiere que el transgén contenga al menos un segmento génico μ y al menos otro segmento génico de región constante, más preferiblemente un segmento génico γ y más preferiblemente $\gamma 3$ o $\gamma 1$. Esta preferencia es para permitir el cambio de clase entre las formas IgM e IgG de la inmunoglobulina codificada y la producción de una forma secretable de inmunoglobulina que no sea IgM de alta afinidad. También pueden usarse otros segmentos génicos de región constante tales como los que codifican la producción de IgD, IgA e IgE.

Los expertos en la materia también construirán transgenes en los que el orden de aparición de genes C_H de cadena pesada será diferente del orden espacial de origen natural encontrado en la línea germinal de la especie que sirve como donante de los genes C_H.

Además, los expertos en la materia pueden seleccionar genes C_H a partir de más de un individuo de una especie (por ejemplo, genes C_H alogénicos) e incorporar dichos genes en el transgén como genes C_H supernumerarios capaces de experimentar cambio de isotipo; el animal transgénico no humano resultante puede entonces, en algunas realizaciones, generar anticuerpos de diversas clases incluyendo todos los alotipos representados en las especies de las que se obtienen los genes C_H de transgén.

Además, los expertos en la materia pueden seleccionar genes C_H de diferentes especies para incorporarlos en el transgén. Con cada gen C_H se incluyen secuencias de cambio funcionales, aunque las secuencias de cambio usadas no son necesariamente las que aparecen de forma natural adyacentes al gen C_H. Las combinaciones de genes C_H interespecie producirán un animal transgénico no humano que puede producir anticuerpos de diversas clases correspondientes a genes C_H de diversas especies. Los animales transgénicos no humanos que contienen transgenes C_H interespecie pueden servir como fuente de células B para construir hibridomas para producir anticuerpos monoclonales para usos veterinarios.

Los segmentos de región J de cadena pesada en ser humano comprenden seis segmentos J funcionales y tres pseudogenes agrupados en una extensión de 3 kb de ADN. Dado su tamaño relativamente compacto y la capacidad de aislar estos segmentos junto con el gen μ y la porción 5' del gen δ en un solo fragmento SfiI/SpI de 23 kb (Sado *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 154: 264271 (1988), que se incorpora en la presente memoria como referencia), se prefiere que todos los segmentos génicos de región J se usen en la construcción de mini-locus. Puesto que este fragmento abarca la región entre los genes μ y δ , es probable que contenga todos los elementos reguladores unidos en cis 3' necesarios para la expresión de μ . Además, debido a que este fragmento incluye la región J completa, contiene el potenciador de cadena pesada y la región de cambio μ (Mills *et al.*, Nature 306: 809 (1983); Yancopoulos y Alt, Ann. Rev. Immunol. 4: 339-368 (1986), que se incorporan en la presente memoria como referencia). También contiene los sitios de inicio de la transcripción que provocan unión VDJ para formar células B de repertorio primario (Yancopoulos y Alt, Cell 40: 271-281 (1985), que se incorpora en la presente memoria como referencia). Como alternativa, puede usarse un fragmento BssHIII/SpeI de 36 kb, que incluye parte de la región D, en lugar del fragmento SfiI/SpI de 23 kb. El uso de dicho fragmento aumenta la cantidad de secuencia flanqueante 5' para facilitar una unión de D a J eficaz.

La región D humana consiste en 4 subregiones de 9 kb homólogas unidas en tándem (Siebenlist, *et al.* (1981), Nature, 294, 631-635). Cada subregión contiene hasta 10 segmentos D individuales. Algunos de estos segmentos se

han mapeado y se muestran en la Figura 4. Se usan dos estrategias diferentes para generar una región D de minilocus. La primera estrategia implica usar sólo los segmentos D localizados en una extensión contigua corta de ADN que incluye una o dos de las subregiones D repetidas. Un candidato es un solo fragmento de 15 kb que contiene 12 segmentos D individuales. Esta pieza de ADN consiste en 2 fragmentos EcoRI contiguos y se ha secuenciado completamente (Ichihara, *et al.* (1988), EMBO J., 7, 4141-4150). Doce segmentos D deberían ser suficientes para un repertorio primario. Sin embargo, dada la naturaleza dispersa de la región D, una estrategia alternativa es ligar entre sí varios fragmentos que contienen segmentos D no contiguos para producir una pieza más pequeña de ADN con un mayor número de segmentos. Pueden identificarse genes de segmento D adicionales, por ejemplo, por la presencia de secuencias de nanómetro y heptámero flanqueantes características, como se ha mencionado anteriormente, y por referencia a la bibliografía.

Se usa al menos uno y preferiblemente más de un segmento génico V para construir el transgén de minilocus de cadena pesada. Pueden aislarse segmentos V reorganizados o no reorganizados con o sin secuencias flanqueantes como se describe en las solicitudes en trámite junto con la presente U.S.S.N. 07/574.748 presentada el 29 de agosto de 1990, PCT/US91/06185 es presentada el 28 de agosto de 1991 y U.S.S.N. 07/810.279 presentada el 17 de diciembre de 1991, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria como referencia.

Pueden aislarse segmentos V, segmentos D, segmentos J y genes C reorganizados o no reorganizados con o sin secuencias flanqueantes, como se describe en las solicitudes en trámite junto con la presente U.S.S.N. 07/574.748 presentada el 29 de agosto de 1990 y PCT/US91/06185 es presentada el 28 de agosto de 1991.

Un transgén de cadena ligera de mini-locus puede construirse de forma similar a partir del locus de inmunoglobulina κ o X humano. Por lo tanto, por ejemplo, una construcción de transgén de minilocus de cadena pesada de inmunoglobulina, por ejemplo, de aproximadamente 75 kb, que codifica las secuencias de región constante V, D y J pueden formarse a partir de una pluralidad de fragmentos de ADN, siendo cada secuencia sustancialmente homóloga a secuencias de genes humanos. Preferiblemente, las secuencias se unen operativamente a secuencias reguladoras de la transcripción y son capaces de experimentar reorganización. Con dos o más secuencias de región constante situadas apropiadamente (por ejemplo, μ y γ) y regiones de cambio, también se produce la recombinación de cambio. De forma similar, puede formarse una construcción de transgén de cadena ligera ejemplar de forma similar a partir de una pluralidad de fragmentos de ADN, sustancialmente homólogos a ADN humano y capaces de experimentar reorganización, como se describe en la solicitud en trámite junto con la presente U.S.S.N. 07/574.748 presentada el 29 de agosto de 1990.

E. Construcciones Transgénicas Con capacidad de Cambio de Isotipo

Idealmente, las construcciones transgénicas que están destinadas a experimentar cambio de clase deberían incluir todas las secuencias que actúan en cis necesarias para regular los transcritos estériles. Las regiones de cambio de origen natural y promotores y secuencias reguladoras cadena arriba (por ejemplo, elementos inducibles por IFN) son secuencias que actúan en cis preferidas que se incluyen en construcciones transgénicas con capacidad de cambio de isotipo. Aproximadamente al menos 50 pares de bases, preferiblemente aproximadamente al menos 200 pares de bases y más preferiblemente al menos de 500 a 1000 pares de bases o más de secuencia inmediatamente cadena arriba de una región de cambio, preferiblemente una región de cambio $\gamma 1$ humana, deberían unirse operativamente a una secuencia de cambio, preferiblemente una secuencia de cambio $\gamma 1$ humana. Además, pueden unirse regiones de cambio cadena arriba de (y adyacentes a) genes C_H que no aparecen de forma natural próximos a la región de cambio particular. Por ejemplo, pero sin limitación, una región de cambio $\gamma 1$ humana puede unirse cadena arriba de un gen $C_H \alpha 2$ humano o un cambio $\gamma 1$ murino puede unirse a un gen C_H humano.

Un método alternativo para obtener cambio de isotipo no clásico (por ejemplo, delección asociada a δ) en ratones transgénicos implica la inclusión de las secuencias de repetición directas de 400 pb ($\delta\mu$ y $\epsilon\mu$) que flanquean el gen μ humano (Yasui *et al.*, Eur. J. Immunol. 19: 1399 (1989)). La recombinación homóloga entre estas dos secuencias deleciona el gen μ en células B sólo IgD. Los transgenes de cadena pesada pueden representarse mediante la descripción de fórmula siguiente:

$$(V_H)_x-(D)_y-(J_H)_z-(S_D)_m-(C_1)_n-[(T)-(S_A)_p-(C_2)]_q$$

en la que:

V_H es un segmento génico de región variable de cadena pesada,

D es un segmento génico de región D (diversidad) de cadena pesada,

J_H es un segmento génico de región J (unión) de cadena pesada,

S_D es un segmento de región donante capaz de participar en un acontecimiento de recombinación con los segmentos de región aceptora S_a de modo que se produzca el cambio de isotipo,

ES 2 345 580 T3

C_1 es un segmento génico de región constante de cadena pesada que codifica un isotipo utilizado para el desarrollo de células B (por ejemplo, μ o γ),

T es un segmento de región reguladora de la transcripción que actúa en cis que contiene al menos un promotor,

S_A es un segmento de región aceptora capaz de participar en un acontecimiento de recombinación con segmentos de región donante S_D seleccionados, de modo que se produce el cambio de isotipo,

C_2 es un segmento génico de región constante de cadena pesada que codifica un isotipo distinto de μ (por ejemplo, $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4, \alpha_1, \alpha_2, \epsilon$). X, y, z, m, n, p y q son números enteros. X es 1-100, n es 0-10, y es 1-50, p es 1-10, z es 1-50, q es 0-50, m es 0-10. Típicamente, cuando el transgén es capaz de cambiar de isotipo, q debe ser al menos 1, m es al menos 1, n es al menos 1 y p es superior a o igual a n.

Los segmentos $V_H, D, J_H, S_D, C_1, T, S_A,$ y C_2 pueden seleccionarse de diversas especies, preferiblemente especies de mamíferos y más preferiblemente de ADN de línea germinal humana y murina.

Los segmentos V_H pueden seleccionarse de diversas especies, pero preferiblemente se seleccionan de segmentos V_H que aparecen de forma natural en la línea germinal humana, tales como V_{H251} . Típicamente, se incluyen aproximadamente 2 segmentos génicos V_H , preferiblemente se incluyen aproximadamente 4 segmentos V_H y más preferiblemente se incluyen al menos aproximadamente 10 segmentos V_H .

Típicamente se incluye al menos un segmento D, aunque se incluyen preferiblemente al menos 10 segmentos D y algunas realizaciones incluyen más de 10 segmentos D. Algunas realizaciones preferidas incluyen segmentos D humanos.

Típicamente, al menos un segmento J_H se incorpora en el transgén, aunque es preferible incluir aproximadamente 6 segmentos J_H , y algunas realizaciones preferidas incluyen más de aproximadamente 6 segmentos J_H . Algunas realizaciones preferidas incluyen segmentos J_H humanos y otras realizaciones preferidas adicionales incluyen 6 segmentos J_H humanos y ningún segmento J_H no humano.

Los segmentos S_D son regiones donantes capaces de participar en acontecimientos de recombinación con el segmento S_A del transgén. Para el cambio de isotipo clásico, S_D y S_A son regiones de cambio tales como $S_\mu, S_{\gamma_1}, S_{\gamma_2}, S_{\gamma_3}, S_{\gamma_4}, S_\alpha, S_{\alpha_2},$ y S_ϵ . Preferiblemente, las regiones de cambio son murinas o humanas, más preferiblemente S_D es una S_μ humana o murina y S_A es una S_{γ_1} humana o murina. Para el cambio de isotipo no clásico (delección asociada con δ), S_D y S_A son preferiblemente las secuencias de repetición directa de 400 pares de bases que flanquean el gen μ humano.

Los segmentos C_1 son típicamente genes μ o δ , preferiblemente un gen μ y más preferiblemente un gen μ humano o murino.

Los segmentos T incluyen típicamente secuencias flanqueantes S' que están adyacentes a regiones de cambio de origen natural (es decir, línea germinal). Los segmentos T son típicamente de al menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente al menos 200 nucleótidos de longitud y más preferiblemente de al menos 500-1000 nucleótidos de longitud. Preferiblemente los segmentos T son secuencias flanqueantes S' que aparecen inmediatamente cadena arriba de regiones de cambio humanas o murinas en una configuración de línea germinal. También es evidente para los expertos en la materia que los segmentos T pueden comprender secuencias reguladoras de la transcripción que actúan en cis que no aparecen de forma natural en una línea germinal animal (por ejemplo, potenciadores y promotores virales tales como los que se encuentran en SV40, adenovirus y otros virus que infectan células eucariotas).

Los segmentos C_2 son típicamente un gen $C_H \gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4, \alpha_1, \alpha_2$ o ϵ , preferiblemente un gen C^H humano de estos isotipos y más preferiblemente un gen γ_1 o γ_3 humano. También puede usarse γ_{2a} y γ_{2b} murino, al igual que genes de isotipo (por ejemplo, cambiado) cadena abajo de diversas especies. Cuando el transgén de cadena pesada contiene un mini-locus de cadena pesada de inmunoglobulina, la longitud total del transgén será típicamente de 150 kilopares de bases o menos.

En general, el transgén será distinto de un locus de Ig de cadena pesada nativo. Por lo tanto, por ejemplo, estará presente la delección de regiones innecesarias o sustituciones con regiones correspondientes de otras especies.

F. Métodos para Determinar el Cambio de Isotipo Funcional en Transgenes de Ig

La aparición de cambio de isotipo en un animal transgénico no humano puede identificarse por cualquier método conocido por los expertos en la materia. Las realizaciones preferidas incluyen lo siguiente, empleado individualmente o en combinación:

1. detección de transcritos de ARNm que contienen una secuencia homóloga al menos a un transgén cadena abajo de un gen C_H distinto de δ y una secuencia adyacente homóloga a un gen reorganizado V_H - D_H - J_H de transgén; dicha detección puede ser por hibridación de Northern, ensayos de protección de nucleasa S_1 , amplificación por PCR, clonación de ADNc u otros métodos;

2. detección en el suero del animal transgénico, o en sobrenadantes de cultivos de células de hibridoma generadas a partir de células B del animal transgénico, de proteínas de inmunoglobulina codificadas por genes C_H cadena abajo, donde también puede demostrarse por métodos inmunológicos que dichas proteínas comprenden una región variable funcional;

3. detección, en el ADN de células B del animal transgénico o en ADN genómico de células de hibridoma, de reorganizaciones de ADN que concuerdan con la aparición de cambio de isotipo en el transgén, pudiendo dicha detección realizarse por hibridación de transferencia de Southern, amplificación por PCR, clonación genómica u otro método; o

4. identificación de otros indicios de cambio de isotipo tales como producción de transcritos estériles, producción de enzimas características implicadas en el cambio (por ejemplo, "recombinasa de cambio") u otras manifestaciones que pueden detectarse, medirse u observarse por técnicas contemporáneas.

Debido a que cada línea transgénica puede representar un sitio diferente de integración del transgén y una serie en tándem potencialmente diferente de insertos de transgén, y debido a que cada configuración diferente de transgén y secuencias de ADN flanqueantes pueden afectar a la expresión génica, es preferible identificar y usar líneas de ratón que expresen altos niveles de inmunoglobulinas humanas, particularmente del isotipo IgG, y contengan el menor número de copias del transgén. Los transgénicos de una sola copia minimizan el problema potencial de una expresión alélica incompleta. Los transgenes se integran típicamente en ADN cromosómico del hospedador, más habitualmente en ADN de línea germinal y se propagan por cría posterior de animales de reserva de reproducción transgénicos de la línea germinal. Sin embargo, otros vectores y métodos transgénicos conocidos en la presente técnica o desarrollados posteriormente pueden sustituirse según sea apropiado y según se desee por el experto en la materia.

Se puede producir un cambio en trans a genes de región constante de cadena pesada no humanos endógenos y producirse cadenas pesadas quiméricas y anticuerpos que comprenden dichas cadenas pesadas humano/ratón quiméricas. Dichos anticuerpos quiméricos pueden desearse para ciertos usos descritos en la presente memoria o pueden ser indeseables.

G. Interrupción Funcional de Loci de Inmunoglobulina Endógenos

Es de esperar que la expresión de transgenes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina reorganizados con éxito tenga un efecto dominante por supresión de la reorganización los genes de inmunoglobulina endógenos en el animal no humano transgénico. Sin embargo, otro modo de generar un animal no humano que esté desprovisto de anticuerpos endógenos es por mutación de los loci de inmunoglobulina endógenos. Usando tecnología de células madre embrionarias y recombinación homóloga, puede eliminarse fácilmente el repertorio de inmunoglobulinas endógenas. A continuación se describe la descripción funcional de los loci de inmunoglobulina de ratón. Los vectores y métodos descritos, sin embargo, pueden adaptarse fácilmente al uso en otros animales no humanos.

En resumen, esta tecnología implica la inactivación de un gen, por recombinación homóloga, en una línea celular pluripotente que es capaz de diferenciarse en tejido de célula germinal. Una construcción de ADN que contiene una copia alterada de un gen de inmunoglobulina de ratón se introduce en los núcleos de células madre embrionarias. En una porción de las células, el ADN introducido se recombina con la copia endógena del gen de ratón, sustituyéndolo con la copia alterada. Las células que contienen la lesión genética recientemente introducida por ingeniería genética se inyectan en un embrión de ratón hospedador, que se reimplanta en una hembra receptora. Algunos de estos embriones se desarrollan en ratones quiméricos que poseen células germinales totalmente derivadas de la línea celular mutante. Por lo tanto, por cría de los ratones quiméricos es posible obtener una nueva línea de ratones que contienen la lesión genética introducida (revisado por Capecchi (1989), Science, 244, 1288-1292).

Debido a que el locus λ de ratón contribuye a solo el 5% de las inmunoglobulinas, es suficiente la inactivación de los loci de cadena ligera κ y/o cadena pesada. Existen tres formas de interrumpir cada uno de estos loci, delección de la región J, delección del potenciador intrónico J-C e interrupción de las secuencias codificantes de la región constante por la introducción de un codón de terminación. La última opción es la más sencilla en términos de diseño de construcción de ADN. La eliminación del gen μ altera la maduración de células B impidiendo de este modo el cambio de clase a cualquiera de los segmentos de cadena pesada funcionales. La estrategia para la anulación (*knocking out*) de estos loci se resume a continuación.

Para interrumpir los genes μ y κ de ratón, se usan vectores de dirección basados en el diseño empleado por Jaenisch y colaboradores (Zijlstra, *et al.* (1989), Nature, 342, 435-438) para la interrupción satisfactoria del gen de microglobulina $\beta 2$ de ratón. El gen de resistencia a neomicina (neo) del plásmido pMCIneo se inserta en la región codificante del gen diana. El inserto de pMCIneo usa una secuencia promotora/potenciadora viral híbrida para dirigir la expresión de neo. Este promotor es activo en células madre embrionarias. Por lo tanto, puede usarse neo como marcador de selección para la integración de la construcción *knock-out*. El gen timidina quinasa (tk) de HSV se añade al final de la construcción como marcador de selección negativa frente a acontecimientos de inserción aleatorios (Zijlstra, *et al.*, mencionado anteriormente).

Una estrategia preferida para interrumpir el locus de cadena pesada es la eliminación de la región J. Esta región es bastante compacta en el ratón, abarcando sólo 1,3 kb. Para construir un vector de dirección de genes, se aísla un

ES 2 345 580 T3

fragmento KpnI de 15 kb que contiene todos los exones de región constante A secretada de la biblioteca genómica de ratón. La región J de 1,3 kb se reemplaza por el inserto de 1,1 kb de pMCIneo. El gen tk de HSV se añade después al extremo 5' del fragmento KpnI. La integración correcta de esta construcción por recombinación homóloga dará como resultado la sustitución de la región J_H de ratón con el gen neo. Se exploran recombinantes por PCR usando un cebador basado en el gen neo y un cebador homólogo a secuencias de ratón 5' del sitio KpnI en la región D.

Como alternativa, el locus de cadena pesada se anula por interrupción de la región codificante del gen μ . Esta estrategia implica el mismo fragmento KpnI de 15 kb usado en la estrategia previa. El inserto de 1,1 kb de pMCIneo se inserta en un sitio BamHI único en el exón II y el gen tk de HSV se añade al extremo KpnI 3'. Después se selecciona a favor de acontecimientos de doble entrecruzamiento en cualquier lado del inserto neo que eliminen el gen tk. Éstos se detectan a partir de combinaciones de los clones seleccionados por amplificación por PCR. Unos de los cebadores de PCR procede de secuencias neo y el otro de secuencias de ratón fuera del vector de dirección. La interrupción funcional de los loci de inmunoglobulina de ratón se presenta en los Ejemplos.

15 G. Supresión de la Expresión de Loci de Inmunoglobulina Endógenos

Además de la interrupción funcional de loci de Ig endógenos, un método alternativo para la prevención de la expresión de un locus de Ig endógeno es la supresión. La supresión de genes de Ig endógenos puede lograrse con ARN antisentido producido a partir de uno o más transgenes integrados, mediante oligonucleótidos antisentido y/o por administración de antisueros específicos para una o más cadenas de Ig endógenas.

Polinucleótidos Antisentido

Pueden emplearse transgenes de ARN antisentido para la expresión parcialmente o totalmente *knock-out* de genes específicos (Pepin *et al.* (1991) *Nature* 355: 725; Helene., C. y Toulme, J. (1990) *Biochimica Biophys. Acta* 1049: 99; Stout, J. and Caskey, T. (1990) *Somat. Cell Mol. Genet.* 16: 369; Munir *et al.* (1990) *Somat. Cell Mol. Genet.* 16: 383, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria como referencia).

Los "polinucleótidos antisentido" son polinucleótidos que: (1) son complementarios a toda o parte de una secuencia de referencia, tal como una secuencia de una región C_H o C_L de Ig endógena y (2) que hibridan específicamente con una secuencia diana complementaria, tal como un locus de gen cromosómico o un ARNm de Ig. Dichos polinucleótidos antisentido complementarios pueden incluir sustituciones, adiciones, deleciones o transposiciones de nucleótidos siempre que la hibridación específica con la secuencia diana pertinente se conserve como una propiedad funcional del polinucleótido. Los polinucleótidos antisentido complementarios incluyen oligonucleótidos de ARN o ADN antisentido solubles que pueden hibridar específicamente con especies de ARNm individuales e impedir la transcripción y/o el procesamiento de ARN de las especies de ARNm y/o la traducción del polipéptido codificado (Ching *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10006-10010 (1989); Broder *et al.*, *Ann. Int. Med.* 113:604-618 (1990); Loreau *et al.*, *FEBS Letters* 274: 53-56 (1990); Holcenberg *et al.*, documentos W091/11535; U.S.S.N. 07/530.165 ("New human CRIPTO gene"); documentos WO91/09865; WO91/04753; WO90/13641; y EP 386563, cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria como referencia). Una secuencia antisentido es una secuencia polinucleotídica que es complementaria al menos a una secuencia génica de inmunoglobulina de al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de longitud, típicamente de al menos 20 a 30 nucleótidos de longitud, y preferiblemente más de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. Sin embargo, en algunas realizaciones, las secuencias antisentido pueden tener sustituciones, adiciones o deleciones en comparación con la secuencia génica de inmunoglobulina complementaria, siempre que se conserve una hibridación específica como propiedad del polinucleótido antisentido. Generalmente, una secuencia antisentido es complementaria a una secuencia génica de inmunoglobulina endógena que codifica, o tiene el potencial de codificar después de la reorganización de ADN, una cadena de inmunoglobulina. En algunos casos, las secuencias con sentido correspondientes a una secuencia génica de inmunoglobulina pueden funcionar suprimiendo la expresión, particularmente por interferencia con la transcripción.

Por lo tanto, los polinucleótidos antisentido inhiben la producción del polipéptido o polipéptidos codificados. A este respecto, los polinucleótidos antisentido que inhiben la transcripción y/o traducción de uno o más loci de Ig endógenos pueden alterar la capacidad y/o especificidad de un animal no humano para producir cadenas de inmunoglobulina codificadas por loci de Ig endógenos.

Pueden producirse polinucleótidos antisentido a partir de un casete de expresión heterólogo en una célula transfectante o célula transgénica, tal como una célula madre hematopoyética pluripotente transgénica usada para reconstituir toda o parte de la población de células madre hematopoyéticas de un individuo o un animal transgénico no humano. Como alternativa, los polinucleótidos antisentido pueden comprender oligonucleótidos solubles que se administran al medio externo, en medio de cultivo *in vitro* o en el sistema circulatorio o líquido intersticial *in vivo*. Se ha demostrado que los polinucleótidos antisentido solubles presentes en el medio externo consiguen acceso al citoplasma e inhiben la traducción de especies de ARNm específicas. En algunas realizaciones, los polinucleótidos antisentido comprenden restos metilfosfonato, alternativamente pueden usarse fosforotiolatos o o-metilribonucleótidos y también pueden usarse oligonucleótidos quiméricos (Dagle *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.* 18: 4751). Para algunas aplicaciones, los oligonucleótidos antisentido pueden comprender ácidos nucleicos de poliamida (Nielsen *et al.* (1991) *Science* 254: 1497). Para métodos generales en relación con polinucleótidos antisentido, véase *Antisense RNA and DNA*, (1988), D.A. Melton, Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Se emplean polinucleótidos antisentido complementarios a una o más secuencias para inhibir la transcripción, el procesamiento de ARN y/o la traducción de especies de ARNm afines y, por lo tanto, de efectuar una reducción en la cantidad del polipéptido codificado respectivo. Dichos polinucleótidos antisentido pueden proporcionar una función terapéutica inhibiendo la formación de una o más cadenas de Ig endógenas *in vivo*.

5 Ya sea como oligonucleótidos antisentido solubles o como ARN antisentido transcrito a partir de un transgén antisentido, los polinucleótidos antisentido de esta invención se seleccionan de modo que hibriden preferentemente con secuencias de Ig endógenas en condiciones fisiológicas *in vivo*. Más típicamente, los polinucleótidos antisentido seleccionados no hibridarán perceptiblemente con secuencias de Ig heterólogas codificadas por un transgén de cadena pesada o ligera de la invención (es decir, los oligonucleótidos antisentido no inhibirán la expresión de Ig de transgén
10 más de aproximadamente el 25 al 35 por ciento).

Supresión de Antisero

15 Puede producirse una supresión parcial o completa de la supresión de cadena de Ig endógena por inyección de ratones con antiseros contra una o más cadenas de Ig endógenas (Weiss *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 81 211, que se incorpora en la presente memoria como referencia). Los antiseros se seleccionan de modo que reaccionen específicamente con una o más cadenas de Ig endógenas (por ejemplo, murina), pero tengan una reactividad cruzada
20 mínima o nula con cadenas de Ig heterólogas codificadas por un transgén de Ig de la invención. Por lo tanto, la administración de antiseros seleccionados de acuerdo con un programa según se tipificó por de Weiss *et al.* en la obra citada suprimirá la expresión de cadena Ig endógena pero permite la expresión de una o más cadenas de Ig heterólogas codificadas por un transgén de la presente invención. Las fuentes de anticuerpo adecuadas para anticuerpo comprenden:

- 25 (1) anticuerpos monoclonales, tales como un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a cadenas μ , γ , κ o λ murinas pero no reacciona con la cadena o cadenas de inmunoglobulina humana codificadas por un transgén de Ig humana de la invención;
- 30 (2) mezclas de dichos anticuerpos monoclonales, de modo que la mezcla se una con múltiples epítopos en una sola especie de cadena de Ig endógena, con múltiples cadenas de Ig endógenas (por ejemplo, μ murina y γ murina, o con múltiples epítopos y múltiples cadenas o inmunoglobulinas endógenas;
- 35 (3) antisuero policlonal o mezclas del mismo, típicamente dicho(s) antisuero/antiseros son monoespecíficos para la unión a una sola especie de cadena de Ig endógena (por ejemplo, μ murina, γ murina, κ murina, λ murina) o para múltiples especies de cadena de Ig endógena, y más preferiblemente dichos antiseros poseen una unión insignificante a cadenas de inmunoglobulina humanas codificadas por un transgén de la invención; y/o
- 40 (4) una mezcla de antisuero policlonal y anticuerpos monoclonales que se unen a una sola o a múltiples especies de cadenas de Ig endógena y más preferiblemente poseen una unión insignificante a cadenas de inmunoglobulina humanas codificadas por un transgén de la invención. Generalmente, se prefieren anticuerpos policlonales y dichos anticuerpos policlonales sustancialmente monoespecíficos pueden producirse ventajosamente a partir de un antisuero generado contra una o más inmunoglobulinas humanas por
45 pre-adsorción con anticuerpos derivados de la especie animal no humana (por ejemplo, murina) y/o, por ejemplo, por cromatografía de afinidad del antisuero o fracción purificada del mismo sobre una resina de afinidad que contiene Ig humana inmovilizada (en la que la fracción unida está enriquecida para el anti-Ig humana deseado en el antisuero; la fracción unida se eluye típicamente con condiciones de bajo pH o una solución de sal caotrópica).

50 Puede emplearse separación de células y/o fijación del complemento para proporcionar el aumento de la reducción del número de células dirigido por anticuerpo de linfocitos que expresan cadenas de inmunoglobulina endógenas (por ejemplo, murinas). En una realización, por ejemplo, se emplean anticuerpos para la reducción *ex vivo* de células hematopoyéticas explantadas que expresan Ig murina y/o linfocitos de linaje B obtenidos de un ratón transgénico
55 que alberga un transgén de Ig humano. Por lo tanto, se explantan células hematopoyéticas y/o linfocitos de linaje B desde un animal transgénico no humano que alberga un transgén de Ig humano (que alberga preferiblemente tanto un transgén de cadena pesada humano como un transgén de cadena ligera humano) y las células explantadas se incuban con un anticuerpo (o anticuerpos) que (1) se une a una inmunoglobulina endógena (por ejemplo, μ y/o κ murina) y (2) carece de una unión sustancial a cadenas de inmunoglobulina humanas codificadas por el transgén o transgenes.
60 Dichos anticuerpos se denominan "anticuerpos de supresión" para una mayor claridad. En la población de células explantadas se reduce selectivamente el número de células que se unen al anticuerpo o anticuerpos de supresión; dicha reducción puede lograrse por varios métodos tales como (1) separación física para eliminar la supresión de células unidas a anticuerpo de células no unidas (por ejemplo, los anticuerpos de supresión pueden unirse a un soporte sólido o perla magnética para inmovilizar y eliminar células que se unen al anticuerpo de supresión), (2) destrucción celular dependiente de anticuerpo de células unidas por el anticuerpo de supresión de (por ejemplo, por ADCC, por fijación
65 del complemento o por una toxina unida al anticuerpo de supresión) y (3) anergia clonal inducida por el anticuerpo de supresión, y similares.

Frecuentemente, los anticuerpos usados para la supresión por anticuerpo de la producción de cadena Ig endógena serán capaces de fijar el complemento. Frecuentemente, es preferible que dichos anticuerpos puedan seleccionarse de modo que reaccionen bien con una fuente de complemento conveniente para la reducción *ex vivo/in vitro*, tal como complemento de conejo o cobaya. Para la reducción *in vivo*, generalmente se prefiere que los anticuerpos supresores posean funciones efectoras en las especies animales transgénicas no humanas; por lo tanto, generalmente se preferiría un anticuerpo de supresión que comprende funciones efectoras murinas (por ejemplo, ADCC y fijación del complemento) para su uso en ratones transgénicos.

En una variación, un anticuerpo de supresión que se une específicamente a una cadena de inmunoglobulina endógena predeterminada se usa para reducción *ex vivo/in vitro* de linfocitos que expresan una inmunoglobulina endógena. Un explante celular (por ejemplo, muestra de linfocitos) de un animal transgénico no humano que alberga un transgén de inmunoglobulina humano se pone en contacto con un anticuerpo de supresión y se reduce el número de células que se unen específicamente al anticuerpo de supresión (por ejemplo, por inmovilización, fijación del complemento y similares), generando de este modo una subpoblación de células reducida en el número en células que expresan inmunoglobulinas endógenas (no humanas) (por ejemplo, linfocitos que expresan Ig murina). La población de linfocitos reducida resultante (células T, células B positivas para Ig humana, etc.) puede transferirse a un animal no humano inmunocompatible (es decir, de MHC compatible) de la misma especie y que sea sustancialmente incapaz de producir un anticuerpo endógeno (por ejemplo, ratones SCID, ratones *knockout* RAG-1 o RAG-2). El animal reconstituido (ratón) puede inmunizarse después con un antígeno (o volver a inmunizarse con un antígeno usado para inmunizar al animal donante del que se obtuvo el explante) para obtener anticuerpos de alta afinidad (madurados por afinidad) y células B que producen dichos anticuerpos. Dichas células B pueden usarse para generar hibridomas por fusión celular convencional y explorarse. Puede usarse anticuerpos de supresión en combinación con otros métodos de inactivación/supresión de Ig endógena (por ejemplo, *knockout* J_H, *knockout* C_H, eliminación de la región D, supresión antisentido, inactivación por cambio de fase de lectura compensada).

25 *Inactivación de Locus de Ig Endógeno Completa*

En determinadas realizaciones es deseable efectuar una inactivación completa de los loci de Ig endógenos de modo que no puedan formarse cadenas de inmunoglobulina híbridas que comprendan una región variable humana y una región constante no humana (por ejemplo, murina) (por ejemplo, por cambio en trans entre secuencias de Ig endógenas y el transgén). Los ratones *knockout* que llevan alelos de cadena pesada endógena que están funcionalmente interrumpidos en la región J_H solamente presentan frecuentemente cambio en trans, típicamente en los que una región variable humana reorganizada (VDJ) codificada por un transgén se expresa como una proteína de fusión unida a una región constante murina endógena, aunque son posibles otras uniones cambiadas en trans. Para superar este problema potencial, generalmente es deseable inactivar completamente el locus de cadena pesada endógeno por cualquiera de diversos métodos, incluyendo pero sin limitación los siguientes: (1) interrumpir funcionalmente y/o deleccionar por recombinación homóloga al menos uno y preferentemente todos los genes de región constante de cadena pesada endógenos, (2) mutar al menos uno y preferiblemente todos los genes de región constante de cadena pesada endógenos para codificar un codón de terminación (o desplazamiento de fase de lectura) para producir un producto truncado o de desplazamiento de fase de lectura (si se ha cambiado en trans) y otros métodos y estrategias evidentes para los expertos en la materia. La delección de una porción sustancial o todos los genes de región constante de cadena pesada y/o genes de región D puede conseguirse por diversos métodos, incluyendo delección secuencial por vectores de dirección de recombinación homóloga, especialmente del tipo “ataque y retirada” y similar. De forma similar, a menudo es preferible la interrupción funcional y/o delección de al menos un locus de cadena ligera endógeno (por ejemplo, κ) para eliminar los genes de región constante de cadena ligera endógenos.

Frecuentemente es deseable emplear un transgén con desplazamiento de fase de lectura en el que el transgén heterólogo comprende un desplazamiento de fase de lectura en el segmento o segmentos J y un desplazamiento de fase de lectura de compensación (es decir, para regenerar la fase de lectura original) en la región inicial (es decir, porción codificante amino-terminal) de uno o más (preferiblemente todos) los genes de región constante de transgén. El cambio en trans a un gen constante de locus de IgH endógeno (que no comprende un desplazamiento de fase de lectura de compensación) dará como resultado un producto truncado o de sentido erróneo que tenga como resultado que la célula B cambiada en trans se deleccione o no se seleccione, suprimiendo de este modo el fenotipo cambiado en trans.

También puede usarse supresión antisentido y supresión por anticuerpo para efectuar una inactivación funcional sustancialmente completa de la expresión del producto génico de Ig endógeno (por ejemplo, secuencias de cadena pesada y ligera murina) y/o anticuerpos con cambio en trans (por ejemplo, anticuerpos quiméricos de región variable humana/constante murina).

Pueden usarse diversas combinaciones de las estrategias de inactivación y supresión para efectuar esencialmente una supresión total de expresión de cadena de Ig endógena (por ejemplo, murina).

65 *Cambio en Trans*

En algunas variaciones, puede ser deseable producir una inmunoglobulina con cambio en trans. Por ejemplo, dichas cadenas pesadas con cambio en trans pueden ser quiméricas (es decir, una región variable no murina (humana) y una región constante murina). Pueden usarse anticuerpos que comprenden dichas inmunoglobulinas con cambio en

trans para una diversidad de aplicaciones en las que es deseable tener una región constante no humana (por ejemplo, murina) (por ejemplo, para la conservación de las funciones efectoras en el hospedador, para la presencia de determinantes inmunológicos murinos, tal como para la unión de un anticuerpo secundario que no se une a regiones constantes humanas). Como ejemplo, un repertorio de regiones variables humanas puede poseer ventajas en comparación con el repertorio de regiones variables murinas con respecto a ciertos antígenos. Presumiblemente, los genes V_H , D , J_H , V_L y J_L humanos se han seleccionado durante la evolución por su capacidad para codificar inmunoglobulinas que se unan a ciertos antígenos evolutivamente importantes; los antígenos que proporcionaban una presión selectiva evolutiva para el repertorio murino pueden ser distintos de los antígenos que proporcionaban una presión evolutiva para conformar el repertorio humano. Pueden existir otras ventajas de repertorio, haciendo que el repertorio de región variable humana sea ventajoso cuando se combina con un isotipo de región constante murina (por ejemplo, murino con cambio en trans). La presencia de una región constante murina puede proporcionar ventajas sobre una región constante humana. Por ejemplo, una región constante γ murina unida a una región variable humana por cambio en trans puede proporcionar un anticuerpo que posee funciones efectoras murinas (por ejemplo, ADCC, fijación del complemento murino), de modo que dicho anticuerpo quimérico (preferiblemente monoclonal), que es reactivo con un antígeno predeterminado (por ejemplo, receptor de IL-2 humano) puede ensayarse en un modelo de enfermedad de ratón, tal como un modelo de ratón de enfermedad de injerto contra hospedador en el que los linfocitos T en el ratón expresan un receptor de IL-2 humano funcional. Posteriormente, la secuencia codificante de la región variable humana puede aislarse (por ejemplo, por amplificación por PCR o clonación de ADNc a partir de la fuente (clon de hibridoma)) y cortarse y empalmarse a una secuencia que codifica una región constante humana deseada para codificar un anticuerpo de secuencia humana más adecuado para uso terapéutico en seres humanos en los que es preferible minimizar la inmunogenicidad. El polinucleótido o polinucleótidos que tienen la secuencia o secuencias codificantes totalmente humanas resultantes pueden expresarse en una célula hospedadora (por ejemplo, a partir de un vector de expresión en una célula de mamífero) y purificarse para su formulación farmacéutica. Para algunas aplicaciones, los anticuerpos quiméricos pueden usarse directamente sin sustituir la región constante murina con una región constante humana. Otras variaciones y usos de anticuerpos quiméricos con cambio en trans serán evidentes para los expertos en la materia.

La presente invención proporciona animales transgénicos no humanos que contienen linfocitos B que expresan anticuerpos quiméricos, que generalmente son el resultado de un cambio en trans entre un transgén de cadena pesada humano y un gen de región constante de cadena pesada murino endógeno. Dichos anticuerpos quiméricos comprenden una región variable de secuencia humana y una región constante murina, generalmente un isotipo murino cambiado (es decir, no μ , no δ). Los animales transgénicos no humanos capaces de generar anticuerpos quiméricos contra un antígeno determinado habitualmente también son competentes para generar anticuerpos de secuencia totalmente humana si se integran los transgenes tanto de cadena pesada humana como de cadena ligera humana que codifican genes de región constante humana y variable humana. Más típicamente, el animal es homocigoto para un locus de cadena ligera y/o locus de cadena pesada funcionalmente interrumpido pero conserva uno o más genes de región constante de cadena pesada endógenos capaces de experimentar cambio en trans (por ejemplo, γ , α , ϵ) y frecuentemente conserva un potenciador unido en cis. Dicho ratón se inmuniza con un antígeno predeterminado, habitualmente en combinación con un adyuvante, y se produce una respuesta inmune que comprende una cantidad detectable de anticuerpos quiméricos que comprenden cadenas pesadas compuestas por regiones variables de secuencia humana unidas a secuencias de región constante murina. Típicamente, el suero de dicho animal inmunizado puede comprender dichos anticuerpos quiméricos a concentraciones de aproximadamente al menos $1 \mu\text{g/ml}$, con frecuencia de aproximadamente al menos $10 \mu\text{g/ml}$, frecuentemente de al menos $30 \mu\text{g/ml}$, y de hasta 50 a $100 \mu\text{g/ml}$ o más. El antisuero que contiene anticuerpos que comprenden cadenas pesadas de región constante de ratón/variable humana quiméricas también comprenden típicamente anticuerpos que comprenden cadenas pesadas de región constante humana/variable humana (secuencia humana completa). Los anticuerpos con cambio en trans quiméricos habitualmente comprenden (1) una cadena pesada quimérica compuesta por una región variable humana y una región constante murina (típicamente una gama murina) y (2) una cadena ligera codificada por transgén humano (típicamente kappa) o una cadena ligera murina (típicamente lambda en un fondo *knockout* para kappa). Dichos anticuerpos con cambio en trans quiméricos generalmente se unen a un antígeno predeterminado (por ejemplo, el inmunógeno) con una avidéz de aproximadamente al menos $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, preferiblemente con una avidéz de aproximadamente al menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, más preferiblemente con una avidéz de al menos $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ a $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ o mayor. Frecuentemente, el antígeno predeterminado es una proteína humana, tal como por ejemplo un antígeno de superficie celular humano (por ejemplo, CD4, CD8, receptor de IL -2, receptor de EGF, receptor de PDGF), otra macromolécula biológica humana (por ejemplo, trombomodulina, proteína C, antígeno de carbohidrato, antígeno Lewis, L-selectina) o macromolécula asociada con enfermedad no humana (por ejemplo, LPS bacteriano, proteína de la cápsida de viriones o glicoproteína de la envuelta) y similar.

La invención proporciona animales transgénicos no humanos que comprenden un genoma que comprende: (1) un locus de cadena pesada endógena funcionalmente interrumpido homocigoto que comprende al menos un gen de región constante murina capaz de experimentar cambio en trans (por ejemplo, en unión cis con una secuencia de recombinación de cambio funcional y típicamente con un potenciador funcional), (2) un transgén de cadena pesada humano capaz de reorganizarse para codificar y expresar una región variable de cadena pesada humana funcional y capaz de experimentar cambio en trans (por ejemplo, que tiene una RSS unida en cis); y que comprende además opcionalmente (3) un transgén de cadena ligera humana (por ejemplo, kappa) capaz de reorganizarse para codificar una región variable de cadena ligera humana funcional y de expresar una cadena ligera de secuencia humana; que comprende opcionalmente además (4) un locus de cadena ligera endógena funcionalmente interrumpido homocigoto (κ , preferiblemente y λ); y que comprende opcionalmente además (5) un suero que comprende un anticuerpo que comprende una cadena pesada quimérica compuesta por una región variable de secuencia humana codificada por un

ES 2 345 580 T3

transgén humano y una secuencia de región constante murina codificada por un gen de región constante de cadena pesada murina endógeno (por ejemplo, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, $\gamma 3$).

5 Dicho ratón transgénico puede comprender además un suero que comprende anticuerpos quiméricos que se unen a un antígeno humano predeterminado (por ejemplo, CD4, CD8, CEA) con una avidez de aproximadamente al menos $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, preferiblemente con una avidez de aproximadamente al menos $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, más preferiblemente con una avidez de al menos $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ a $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ o más. Frecuentemente, pueden generarse hibridomas en los que los anticuerpos monoclonales producidos por los mismos tengan una avidez de al menos $8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. También pueden estar presentes en el suero o como anticuerpos secretados a partir de un hibridoma anticuerpos quiméricos
10 que comprenden una cadena pesada compuesta por una región constante murina y una región variable humana, con frecuencia capaces de unirse a un antígeno no humano.

En algunas variaciones, es deseable generar ratones transgénicos que tengan loci de cadena pesada de ratón endógenos inactivados que conserven intactos genes de región constante de cadena pesada y que tengan un transgén de
15 cadena pesada humano capaz de experimentar un cambio en trans, y que tengan también opcionalmente un transgén de cadena ligera humano, opcionalmente con uno o más loci de cadena ligera de ratón endógenos inactivados. Dichos ratones pueden producir ventajosamente células B capaces de expresar alternativamente anticuerpos que comprenden cadenas pesadas totalmente humanas y anticuerpos que comprenden cadenas pesadas quiméricas (región variable humana/constante murina) por cambio en trans. El suero de dichos ratones contendría anticuerpos que comprenden
20 cadenas pesadas totalmente humanas y anticuerpos que comprenden cadenas pesadas quiméricas (región variable humana/constante murina), preferiblemente en combinación con cadenas ligeras totalmente humanas. Pueden generarse hibridomas a partir de las células B de dichos ratones.

Generalmente, dichos anticuerpos quiméricos pueden generarse por cambio en trans, en el que un transgén humano
25 que codifica una región variable humana (codificada por una reorganización V-D-J productiva *in vivo*) y una región constante humana, típicamente μ humana, experimenta una recombinación de cambio con una secuencia de cambio de gen constante de inmunoglobulina no transgénico (RSS) uniendo operativamente de este modo a la región variable humana codificada por el transgén con una región constante de cadena pesada que no está codificada por dicho transgén, típicamente una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina murina endógena o una región constante
30 de cadena pesada heteróloga (por ejemplo, humana) codificada por un segundo transgén. Mientras que el cambio en cis se refiere al cambio de isotipo por recombinación de elementos RSS dentro de un transgén, el cambio en trans implica la recombinación entre una RSS de transgén y un elemento de RSS fuera del transgén, con frecuencia en un cromosoma diferente del cromosoma que alberga el transgén.

35 El cambio en trans se produce generalmente entre una RSS de un gen de región constante de cadena pesada transgénico expresado y una RSS de un gen de región constante murina endógeno (de un isotipo no μ , típicamente γ) o una RSS de un gen de región constante humano contenida en un segundo transgén, con frecuencia integrado en un cromosoma separado.

40 Cuando se produce cambio en trans entre una RSS de un primer gen de región constante de cadena pesada de transgén expresado (por ejemplo, μ) y una RSS de un gen de región constante de cadena pesada humana contenido en un segundo transgén, se produce un anticuerpo no quimérico que tiene una secuencia sustancialmente humana en su totalidad. Por ejemplo, y sin limitación, un polinucleótido que codifica una región constante de cadena pesada humana (por ejemplo, $\gamma 1$) y una RSS unida operativamente (por ejemplo, una RSS $\gamma 1$) puede introducirse (por ejemplo, por
45 transfección) en una población de células de hibridoma generada a partir de una célula B de ratón transgénico (o población de células B) que expresa un anticuerpo que comprende una cadena μ humana codificada por transgén. Las células de hibridoma resultantes pueden seleccionarse por la presencia del polinucleótido introducido y/o por la expresión de un anticuerpo con cambio en trans que comprende una cadena pesada que tiene la región variable (reactividad de idiotipo/antígeno) de la cadena μ humana y que tiene la región constante codificada por la secuencia polinucleotídica introducida (por ejemplo, $\gamma 1$ humana). La recombinación de cambio en trans entre la RSS de la
50 cadena μ humana codificada por transgén y la RSS del polinucleótido introducido que codifica un isotipo cadena abajo (por ejemplo, $\gamma 1$) puede generar de ese modo un anticuerpo con cambio en trans.

La invención también proporciona un método para producir dichos anticuerpos con cambio en trans quiméricos
55 que comprende la etapa de inmunizar con un antígeno predeterminado un ratón transgénico que comprende un genoma que comprende: (1) un locus de cadena pesada endógeno funcionalmente interrumpido homocigoto que comprende al menos un gen de región constante murina capaz de experimentar un cambio en trans (por ejemplo, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, $\gamma 1$, $\gamma 3$), (2) un transgén de cadena pesada humana capaz de reorganizarse para codificar una región variable de cadena pesada humana funcional y expresar una cadena pesada de secuencia humana capaz de experimentar un cambio de isotipo
60 (y/o cambio en trans) y que comprende además opcionalmente (3) un transgén de cadena ligera humana (por ejemplo, kappa) capaz de reorganizarse para codificar una región variable de cadena ligera humana funcional (por ejemplo, kappa) y expresar una cadena ligera de secuencia humana, y que comprende además opcionalmente (4) un locus de cadena ligera endógena funcionalmente interrumpido homocigoto (típicamente κ , preferiblemente tanto κ como X) y que comprende además opcionalmente (5) un suero que comprende un anticuerpo que comprende una cadena
65 pesada quimérica compuesta por una región variable de secuencia humana codificada por un transgén humano y una secuencia de región constante murina codificada por un gen de región constante de cadena pesada murino endógeno (por ejemplo, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, $\gamma 3$).

Marcaje por Afinidad: Selección de Isotipos Cambiados

Ventajosamente, el cambio en trans (y cambio en cis) se asocia con el proceso de mutación somática. La mutación somática abarca el intervalo de afinidades de anticuerpo codificado por la progenie clonal de una célula B. Por ejemplo, los anticuerpos producidos por células de hibridoma que han experimentado cambio (en trans o en cis) representan un intervalo más amplio de afinidades de unión de antígeno que el presente en células de hibridoma que no han experimentado cambio. Por lo tanto, una población de células de hibridoma (típicamente clonal) que expresa un primer anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una primera región variable de cadena pesada humana en unión polipeptídica con una primera región constante de cadena pesada humana (por ejemplo, μ) puede explorarse en relación con los variantes clonales de células de hibridoma que expresen un anticuerpo que comprende una cadena pesada que contienen dicha primera región variable de cadena pesada humana en unión polipeptídica con una segunda región constante de cadena pesada (por ejemplo, región constante γ , α o ε humana). Dichas variantes clonales pueden producirse por variación clonal natural que produce cambio en cis *in vitro*, por inducción de cambio de clase (en trans o en cis) como por la administración de agentes que promueven el cambio de isotipo, tales como linfocinas derivadas de células T (por ejemplo, IL -4 e IFN γ), por introducción de un polinucleótido que comprende una RSS funcional y un gen de región constante de cadena pesada heterólogo (por ejemplo, humano) para servir como sustrato para el cambio en trans, o por una combinación de los anteriores, y similares. Con frecuencia, los polinucleótidos que contienen una región constante de isotipo cadena abajo humana (por ejemplo, $\gamma 1$, $\gamma 3$ y similares) con una RSS unida operativamente también se introducirán en células de hibridoma para promover el cambio de isotipo por medio del mecanismo de cambio en trans.

El cambio de clase y la maduración por afinidad tienen lugar dentro de de la misma población de células B derivada de animales transgénicos de la presente invención. Por lo tanto, la identificación de células B con cambio de clase (o hibridomas derivados de las mismas) puede usarse como etapa de exploración para obtener anticuerpos monoclonales de alta afinidad. Puede emplearse una diversidad de estrategias para facilitar acontecimientos de cambio de clase tales como cambio en cis (cambio intra-transgén), cambio en trans o ambos. Por ejemplo, puede usarse un solo fragmento genómico humano continuo que comprende genes de región constante tanto μ como γ con los elementos RSS asociados y elementos reguladores de cambio (por ejemplo, promotor de transcrito estéril) como transgén. Sin embargo, algunas porciones del fragmento genómico humano contiguo individual deseado pueden ser difíciles de clonar eficazmente, tal como debido a problemas de inestabilidad cuando se replica en un hospedador de clonación o similar; en particular, en general la región entre δ y $\gamma 3$ puede demostrar dificultad de para clonarse eficazmente, especialmente como un fragmento contiguo que comprende el gen μ , gen $\gamma 3$, un gen V, y segmentos génicos D y segmentos génicos J.

También, por ejemplo, un transgén humano discontinuo (minigen) compuesto por un gen μ humano, gen $\gamma 3$ humano, uno o más genes V humanos, segmentos génicos D humanos y segmentos génicos J humanos con una o más deleciones de una secuencia intermedia (intrónica) o de otro modo no esencial (por ejemplo, uno o más segmentos V, D y/o J y/o uno o más genes de región constante no μ). Dichos minigenes tienen varias ventajas en comparación con el aislamiento de un solo segmento contiguo de ADN genómico que abarca todos los elementos esenciales para una expresión y cambio de inmunoglobulina eficaz. Por ejemplo, dicho minigen evita la necesidad de aislar grandes fragmentos de ADN que pueden contener secuencias que son difíciles de clonar (por ejemplo, secuencias inestables, secuencias venenosas y similares). Además, los miniloci que comprenden elementos necesarios para el cambio de isotipo (por ejemplo, promotor de transcrito estéril γ humano) para producir cambio en cis o en trans pueden experimentar ventajosamente una mutación somática y un cambio de clase *in vivo*. Como muchas secuencias de ARN eucariotas pueden resultar ser difíciles de clonar, la omisión de secuencias no esenciales puede resultar ventajosa.

En una variación, se obtienen clones de hibridoma que producen anticuerpos que tienen alta avidéz de unión (por ejemplo, al menos $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, preferiblemente al menos $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, más preferiblemente al menos $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ o superior) por selección a partir de una combinación de células de hibridoma derivadas de células B de ratones transgénicos que albergan un transgén de cadena pesada humana capaz de experimentar cambio de isotipo (véase anteriormente) y que carece sustancialmente de loci de cadena pesada murina endógenos capaces de experimentar una reorganización V-D-J productiva (en fase de lectura), hibridomas que expresan un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia humana en unión polipeptídica con una región constante de cadena pesada no μ humana (o de ratón); dichos anticuerpos se denominan "anticuerpos con cambio" ya que comprenden una "cadena pesada cambiada" que se produce como consecuencia de cambio en cis y/o cambio en trans *in vivo* o en cultivo celular. Los hibridomas que producen anticuerpos con cambio generalmente han experimentado el proceso de mutación somática, y una combinación de dichos hibridomas tendrá generalmente un intervalo más amplio de avidéces de unión a antígeno, pudiendo seleccionarse a partir de dicha combinación clones de hibridoma que secretan anticuerpos de alta avidéz. Típicamente, los hibridomas que secretan un anticuerpo de secuencia humana que tienen una avidéz de unión sustancial (superior a $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ a $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) por un antígeno predeterminado y en los que dicho anticuerpo de secuencia humana comprende una o más regiones variables de inmunoglobulina humana pueden seleccionarse por un método que comprende un proceso de dos etapas, siendo una etapa identificar y aislar células de hibridoma que secreten inmunoglobulinas que comprenden una cadena pesada cambiada (por ejemplo, por unión de células de hibridoma a una inmunoglobulina inmovilizada que se une específicamente a una cadena pesada cambiada y que no se une sustancialmente a un isotipo no cambiado, por ejemplo, μ). La otra etapa es identificar células de hibridoma que se unan al antígeno predeterminado con una avidéz de unión sustancial (por ejemplo, por ELISA de sobrenadantes de clones de hibridoma, análisis de FACS usando un antígeno marcado y similares). Típicamente, la selección de hibridomas que secretan anticuerpos con cambio se realiza antes de identificar células de hibridoma que se unen a un antígeno predeterminado. Las células de hibridoma que expresan

anticuerpos con cambio que tienen una avidez de unión sustancial por el antígeno predeterminado se aíslan y cultivan en condiciones de cultivo adecuadas conocidas en la técnica, típicamente como clones seleccionados individuales. Opcionalmente, el método comprende la etapa de cultivar dichos clones seleccionados en condiciones adecuadas para la expresión de anticuerpos monoclonales; dichos anticuerpos monoclonales se recogen y pueden administrarse con fines terapéuticos, profilácticos y/o de diagnóstico.

Con frecuencia, los clones de hibridoma seleccionados pueden servir como fuente de ADN o ARN para aislar secuencias de inmunoglobulina que codifiquen inmunoglobulinas (por ejemplo, una región variable) que se unen (o confieren unión) al antígeno predeterminado. Posteriormente, la secuencia codificante de región variable humana puede aislarse (por ejemplo, por amplificación por PCR o clonación de ADNc a partir de la fuente (clon de hibridoma)) y cortarse y empalmarse con una secuencia que codifique una región constante humana deseada para codificar anticuerpos de secuencia humana más adecuados para usos terapéuticos en seres humanos, en los que preferiblemente se minimiza la inmunogenicidad. El polinucleótido o polinucleótidos que tienen la secuencia o secuencias codificantes totalmente humanas resultantes pueden expresarse en una célula hospedadora (por ejemplo, a partir de un vector de expresión en una célula de mamífero) y purificarse para su formulación farmacéutica.

Xenopotenciadores

Un transgén heterólogo capaz de codificar una inmunoglobulina humana (por ejemplo, una cadena pesada) comprende ventajosamente un potenciador unido en cis que no procede del genoma de ratón y/o que no está naturalmente asociado en cis con los exones del transgén heterólogo. Por ejemplo, un transgén κ humano (por ejemplo, un minilocus κ) puede comprender ventajosamente un gen V_{κ} humano, un gen J_{κ} humano, un gen C_{κ} humano y un xenopotenciador, típicamente dicho xenopotenciador comprende un potenciador intrónico de cadena pesada humana y/o un potenciador intrónico de cadena pesada murina, típicamente localizado entre un gen J_{κ} y el gen C_{κ} o localizado cadena abajo del gen C_{κ} . Por ejemplo, el potenciador intrónico de cadena pesada $J-\mu$ de ratón (Banerji *et al.* (1983) Cell 33: 729) puede aislarse en un fragmento XbaI de 0,9 kb del plásmido pKVe2 (véase, a continuación). El potenciador intrónico de cadena pesada $J-\mu$ humano (Hayday *et al.* (1984) Nature 307: 334) puede aislarse como un fragmento MluI/HindIII de 1,4 kb (véase a continuación). Además de un xenopotenciador transcripcionalmente activo para un transgén, tal como un xenopotenciador combinado que consiste esencialmente en un potenciador intrónico $J-\mu$ humano unido en cis a un potenciador intrónico $J-\mu$ de ratón, puede conferir altos niveles de expresión del transgén, especialmente cuando dicho transgén codifica una cadena ligera, tal como κ humana. De forma similar, un potenciador 3' de rata puede incluirse ventajosamente en una construcción de minilocus capaz de codificar una cadena pesada humana.

Realizaciones Preferidas Específicas

Una realización preferida de la invención es un animal que contiene al menos una, típicamente 2-10, y a veces 25-50 o más copias del transgén descrito en el Ejemplo 12 (por ejemplo, pHc1 o pHc2) cruzado con un animal que contiene una sola copia de un transgén de cadena ligera descrito en los Ejemplos 5, 6, 8 ó 14, y el cruce de la descendencia con el animal con J_H delecionada descrito en el Ejemplo 10. Los animales se cruzan hasta obtener una línea homocigota para cada uno de estos tres rasgos. Dichos animales tienen el genotipo siguiente: una sola copia (por conjunto haploide de cromosomas) de un minilocus no reorganizado de cadena pesada humana (descrito en el Ejemplo 12), una sola copia (por conjunto haploide de cromosomas) de una construcción de cadena ligera κ humana reorganizada (descrita en el Ejemplo 14) y una deleción en cada locus de cadena pesada de ratón endógeno que elimina todos los segmentos J_H funcionales (descrito en el Ejemplo 10). Dichos animales se cruzan con ratones que son homocigotos para la deleción de los segmentos J_H (Ejemplos 10) para producir descendencia que sea homocigota para la deleción J_H y hemicigota para las construcciones de cadena ligera y pesada humana. En los animales resultantes se inyectan antígenos y se usan para la producción de anticuerpos monoclonales humanos contra estos antígenos.

Las células B aisladas a partir de dicho animal son monoespecíficas con respecto a las cadenas ligera y pesada humanas porque contienen solamente una sola copia de cada gen. Además, serán monoespecíficas con respecto a las cadenas pesadas de ratón o humanas porque ambas copias de genes de cadena pesada de ratón endógenas no son funcionales en virtud de la deleción que abarca la región J_H introducida como se describe en el Ejemplo 9 y 12. Además, una fracción sustancial de las células B será monoespecífica con respecto a las cadenas ligeras humana o de ratón debido a que la expresión de la sola copia del gen de cadena ligera κ humana reorganizado excluirá alelicamente e isotípicamente la reorganización de los genes de cadena κ y λ de ratón endógenos en una fracción significativa de células B.

El ratón transgénico de la realización preferida presentará producción de inmunoglobulina con un repertorio significativo, idealmente sustancialmente similar al de un ratón nativo. Por lo tanto, por ejemplo, en realizaciones en las que los genes de Ig endógenos se han inactivado, los niveles de inmunoglobulina total variarán de aproximadamente 0,1 a 10 mg/ml de suero, preferiblemente de 0,5 a 5 mg/ml, e idealmente serán de al menos aproximadamente 1,0 mg/ml. Cuando un transgén capaz de efectuar un cambio a IgG desde IgM se ha introducido en el ratón transgénico, la proporción de IgG respecto a IgM en suero de ratón adulto es preferiblemente de aproximadamente 10:1. Por supuesto, la proporción de IgG respecto a IgM será mucho menor en el ratón inmaduro. En general, más de aproximadamente el 10%, preferiblemente del 40 al 80% de las células B de bazo y ganglio linfático expresan exclusivamente a proteína IgG humana.

ES 2 345 580 T3

El repertorio se aproximará idealmente al mostrado en un ratón no transgénico, habitualmente en al menos aproximadamente hasta un 10%, preferiblemente del 25 al 50% o más. Generalmente se producirán al menos aproximadamente mil inmunoglobulinas diferentes (idealmente IgG), preferiblemente de 10^4 a 10^6 o más, dependiendo principalmente del número de regiones V, J y D diferentes introducidas en el genoma de ratón. Estas inmunoglobulinas reconocerán típicamente aproximadamente la mitad o más de proteínas altamente antigénicas incluyendo, pero sin limitación, citocromo C de paloma, lisozima de pollo, mitógeno de hierba carmín, albúmina sérica bovina, hemocianina de lapa californiana, hemaglutinina de influenzavirus, proteína A de estafilococos, mioglobina de esperma de ballena, neuraminidasa de influenzavirus y proteína represora lambda, y algunas de las inmunoglobulinas presentará una avidez por antígenos preseleccionados de al menos aproximadamente 10^7 M^{-1} , preferiblemente de 10^8 M^{-1} a 10^9 M^{-1} o superior.

En algunas realizaciones, puede ser preferible generar ratones con repertorios predeterminados para limitar la selección de genes V representada en la respuesta de anticuerpos contra un tipo de antígeno predeterminado. Un transgén de cadena pesada que tiene un repertorio predeterminado puede comprender, por ejemplo, genes V_H humanos que se usan preferentemente en respuestas de anticuerpos contra el tipo de antígeno predeterminado en seres humanos. Como alternativa, algunos genes V_H pueden excluirse de un repertorio definido por diversas razones (por ejemplo, tienen una baja probabilidad de codificar regiones v de alta afinidad por el antígeno predeterminado; tienen una baja propensión a experimentar mutación somática y mejorar la afinidad; o son inmunogénicos para determinados seres humanos).

Por lo tanto, antes de la reorganización de un transgén que contiene diversos segmentos génicos de cadena ligera o pesada, dichos segmentos génicos pueden identificarse fácilmente, por ejemplo, por hibridación o secuenciación de ADN, como procedentes de una especie de organismo distinta del animal transgénico.

El ratón transgénico de la presente invención puede inmunizarse con un antígeno predeterminado, tal como una proteína transmembrana, macromolécula de la superficie celular u otro antígeno adecuado (por ejemplo, TNF, LPS, etc) para el que sería deseable un anticuerpo humano. El ratón producirá células B que experimenten cambio de clase por recombinación de cambio intratransgénica (cambio en cis) y expresen inmunoglobulinas reactivas con el antígeno predeterminado. Las inmunoglobulinas pueden ser anticuerpos de secuencia humana en los que los polipéptidos de cadena ligera y pesada estén codificados por secuencias de transgenes humanos, que pueden incluir secuencias obtenidas por mutación somática y uniones recombinatorias de región V, así como secuencias codificadas por la línea germinal; puede hacerse referencia a estas inmunoglobulinas de secuencia humana como secuencias que son sustancialmente idénticas a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico V_L o V_H humano y un segmento J_L o J_H humano, aunque puedan estar presentes otras secuencias que no sean de la línea germinal como resultado de la mutación somática y de las uniones de recombinación V-J y V-D-J diferenciales. Con respecto a dichos anticuerpos de secuencia humana, las regiones variables de cada cadena están codificadas, típicamente en al menos el 80 por ciento, por segmentos génicos V, J y en el caso de cadenas pesadas D, de la línea germinal humana; frecuentemente, al menos el 85 por ciento de las regiones variable están codificadas por secuencias de la línea germinal humana presentes en el transgén; con frecuencia el 90 ó 95 por ciento o más de las secuencias de región variable están codificadas por secuencias de la línea germinal humana presentes en el transgén. Sin embargo, puesto que las secuencias que no son de la línea germinal se introducen por mutación somática y unión VJ y VDJ, los anticuerpos de secuencia humana tendrán frecuentemente algunas secuencias de región variable (y menos frecuentemente secuencias de región constante) que no estén codificadas por segmentos génicos V, D o J humanos como se encuentra en el transgén o transgenes humanos en la línea germinal de los ratones. Típicamente, dichas secuencias que no son de la línea germinal (o posiciones de nucleótidos individuales) se agruparán en o próximas a CDR, o en regiones en las que se sabe que se agrupan las mutaciones somáticas.

Los anticuerpos de secuencia humana que se unen al antígeno predeterminado pueden ser el resultado de cambio de isotipo, de modo que se producen anticuerpos humanos que comprenden una cadena γ de secuencia humana (tal como $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2B$ o $\gamma 3$) y una cadena ligera de secuencia humana (tal como K). Dichos anticuerpos de secuencia humana de isotipo cambiado contienen con frecuencia una o más mutaciones somáticas, típicamente en la región variable y con frecuencia en o dentro de aproximadamente 10 restos de una CDR como resultado de la maduración por afinidad y la selección de células B por antígeno, particularmente posterior a una exposición a antígeno secundaria (o posterior). Estos anticuerpos de secuencia humana de alta avidez pueden tener avideces de unión de al menos 1×10^9 M^{-1} , típicamente al menos 5×10^{10} M^{-1} , frecuentemente más de 1×10^{10} M^{-1} y a veces 5×10^{10} M^{-1} a 1×10^{11} o superiores. Dichos anticuerpos de secuencia humana de alta avidez pueden generarse con alta avidez de unión por antígenos humanos, tales como CD4 humano y las macromoléculas humanas similares (por ejemplo, tales como una proteína de superficie celular o transmembrana humana u otro antígeno de la superficie celular).

Las células B de dichos ratones pueden usarse para generar hibridomas que expresen anticuerpos de secuencia humana monoclonales de alta avidez (superior a 2×10^9 M^{-1}) contra una diversidad de antígenos, incluyendo proteínas humanas tales como CD4 y similares. Estos hibridomas pueden usarse para generar una composición que comprende una inmunoglobulina que tiene una constante de avidez (K_a) de al menos 2×10^9 M^{-1} para la unión a un antígeno humano predeterminado, en los que dicha inmunoglobulina consiste en:

una cadena ligera de secuencia humana compuesta por (1) una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico V_L humano y un segmento J_L humano y (2) una región constante de cadena ligera que tiene

ES 2 345 580 T3

una secuencia polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico C_L humano; y

5 una cadena pesada de secuencia humana compuesta por (1) una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico V_H humano, opcionalmente una región D y un segmento J_H humano y (2) una región constante que tiene una secuencia polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico C_H humano.

10 Con frecuencia, la cadena pesada de secuencia humana y la cadena ligera de secuencia humana están codificadas por separado por un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera humano respectivamente, que se integran en un genoma de una célula de ratón. Sin embargo, ambas cadenas pueden estar codificadas en un solo transgén o una o ambas cadenas pueden estar codificadas en múltiples transgenes, tales como un transgén de cadena pesada humana (por ejemplo, HC2) que procede de un segmento génico v de un YAC que contiene una serie V_H que no está integrada en el mismo locus que el transgén de cadena pesada humana en la línea germinal de ratón.

En una realización, la composición tiene una inmunoglobulina que comprende una cadena ligera de secuencia humana que tiene una región constante κ y una cadena pesa de secuencia humana que tiene una región constante γ .

20 Los ratones (e hibridomas derivados de los mismos) son una fuente de inmunoglobulina que tiene una constante de avidéz (K_a) de al menos $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ por la unión a un antígeno humano predeterminado, en los que dicha inmunoglobulina consiste en:

25 una cadena ligera de secuencia humana compuesta por (1) una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico V_L humano y un segmento J_L humano y (2) una región constante de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico C_L humano; y

30 una cadena pesada de secuencia humana compuesta por (1) una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico V_H humano, opcionalmente una región D y un segmento J_H humano, y (2) una región constante que tiene una secuencia polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico C_H humano.

35 La invención proporciona un ratón transgénico que comprende: un par homocigoto de alelos de cadena pesada endógena funcionalmente interrumpidos, un par homocigoto de alelos de cadena ligera endógena funcionalmente interrumpidos, al menos una copia de un transgén de cadena ligera de inmunoglobulina heterólogo y al menos una copia de un transgén de cadena pesada de inmunoglobulina heterólogo y en el que dicho animal genera una respuesta de anticuerpos después de la inmunización con un antígeno humano en el que la respuesta de anticuerpos comprende una inmunoglobulina que tiene una constante de avidéz (K_a) de al menos $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, para su unión a un antígeno humano predeterminado, donde dicha inmunoglobulina consiste en:

45 una cadena ligera de secuencia humana compuesta por (1) una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico V_L humano y un segmento J_L humano y (2) una región constante de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico C_L humano; y

50 una cadena pesada de secuencia humana compuesta por (1) una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico V_H humano, opcionalmente una región D, y un segmento J_H humano y (2) una región constante que tiene una secuencia polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico C_H humano.

55 Dicho ratón transgénico puede producir una inmunoglobulina de secuencia humana que se une a una proteína transmembrana o de superficie humana presente en al menos un tipo de célula somática de un ser humano, en el que la inmunoglobulina se une a dicha proteína transmembrana o de superficie humana con una constante de avidéz (K_a) de entre $1,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ y $1,8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Un ejemplo de dicha proteína transmembrana o de superficie humana es CD4, aunque pueden usarse otras como inmunógenos según se desee.

65 El desarrollo de anticuerpos de secuencia humana de alta avidéz contra antígenos predeterminados se facilita por un método para expandir el repertorio de segmentos génicos de región variable humana en un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de inmunoglobulina humano integrado, comprendiendo dicho método introducir en el genoma un transgén de gen V que comprende segmentos génicos de región V que no están presentes en dicho transgén de inmunoglobulina humana integrado. Con frecuencia, el transgén de región V es un cromosoma artificial de levadura que comprende una porción de una serie de segmentos génicos (V_κ) V_H o V_L humanos, como puede aparecer de forma natural en un genoma humano o como pueden cortarse y empalmarse entre sí por separado

por métodos recombinantes, que pueden incluir segmentos génicos V omitidos o fuera de servicio. Con frecuencia, al menos cinco o más segmentos génicos V funcionales están contenidos en el YAC. En esta variación, es posible generar un ratón transgénico producido por el método de expansión de repertorio V, en el que el ratón expresa una cadena de inmunoglobulina que comprende una secuencia de región variable codificada por un segmento génico de región V presente en el transgén de región V y una región C codificada en el transgén de Ig humana. Por medio del método de expansión de repertorio V, pueden generarse ratones transgénicos que tengan al menos 5 genes V diferentes; al igual que pueden generarse ratones que contengan al menos aproximadamente 24 genes V o más. Por supuesto, algunos segmentos génicos V pueden no ser funcionales (por ejemplo, pseudogenes y similares); estos segmentos pueden conservarse o pueden delecionarse selectivamente por métodos recombinantes disponibles por el experto si se desea.

Una vez que se ha modificado por ingeniería genética la línea germinal de ratón para contener un YAC funcional que tenga un repertorio de segmento V expandido, sustancialmente no presente en el transgén de Ig humana que contiene los segmentos génicos J y C, el rasgo puede propagarse y cruzarse en otros fondos genéticos, incluyendo fondos en los que el YAC funcional que tiene un repertorio de segmentos V ampliado se cruza en una línea germinal de ratón que tiene un transgén de Ig humana diferente. Múltiples YAC funcionales que tienen un repertorio de segmento V ampliado pueden cruzarse en una línea germinal para funcionar con un transgén de Ig humana (o múltiples transgenes de Ig humana). Aunque se denominan en la presente memoria transgenes YAC, dichos transgenes cuando se integran en el genoma pueden carecer sustancialmente de secuencias de levadura, tales como secuencias necesarias para la replicación autónoma en levaduras; dichas secuencias pueden eliminarse opcionalmente por ingeniería genética (por ejemplo, digestión de restricción y electroforesis en gel de campo pulsado u otro método adecuado) después de que la replicación en levadura ya no sea necesaria (es decir, antes de la introducción en una célula ES de ratón o procigoto de ratón).

La invención también proporciona un método de propagación del rasgo de expresión de inmunoglobulina de secuencia humana que comprende cruzar un ratón transgénico que tiene el transgén o transgenes de Ig humana y que tiene opcionalmente también un YAC funcional que tiene un repertorio de segmentos V ampliado. Pueden estar presentes segmentos génicos tanto V_H como V_L en el YAC. El ratón transgénico puede cruzarse en cualquier fondo deseado por el experto en la materia, incluyendo fondos que albergan otros transgenes humanos, incluyendo transgenes de Ig humana y/transgenes que codifican otras proteínas de linfocitos humanos.

La invención también proporciona una inmunoglobulina de secuencia humana de alta avidéz producida por un ratón transgénico que tiene un transgén de YAC de repertorio de región v ampliado.

Aunque lo anterior describe una realización preferida del animal transgénico de la invención, otras realizaciones se definen por la descripción de la presente memoria y más particularmente por los transgenes descritos en los Ejemplos. Pueden definirse cuatro categorías de animal transgénico:

- I. Animales transgénicos que contienen un transgén de inmunoglobulina de cadena pesada no reorganizada y cadena ligera reorganizada.
- II. Animales transgénicos que contienen un transgén de inmunoglobulina de cadena pesada no reorganizada y cadena ligera no reorganizada.
- III. Animales transgénicos que contienen un transgén de inmunoglobulina de cadena pesada reorganizada y cadena ligera no reorganizada y
- IV. Animales transgénicos que contienen transgenes de inmunoglobulina de cadena pesada reorganizada y cadena ligera reorganizada.

De estas categorías de animal transgénico, el orden de preferencia preferido es como sigue $II > I > III > IV$ en el que los genes de cadena ligera endógenos (o al menos el gen κ) se han anulado por recombinación homóloga (u otro método) e $I > II > III > IV$ cuando los genes de cadena ligera endógenos no se han anulado y deben dominarse por exclusión alélica.

Como se ha analizado anteriormente, la invención proporciona anticuerpos monoclonales de secuencia humana que son útiles en el tratamiento de enfermedades humanas. Los usos terapéuticos de anticuerpos monoclonales se analizan en, por ejemplo, Larrick y Bourla, *Journal of Biological Response Modifiers*, 5: 379-393, que se incorpora en la presente memoria como referencia. Los usos de anticuerpos monoclonales humanos incluyen el tratamiento de enfermedades autoinmunes, cáncer, enfermedades infecciosas, rechazo de trasplantes, trastornos sanguíneos tales como trastornos de la coagulación y otras enfermedades.

Los anticuerpos de esta invención pueden administrarse a pacientes por cualquier método conocido en la técnica médica para la administración de proteínas. Los anticuerpos son particularmente adecuados para la administración parenteral (es decir, administración subcutánea, intramuscular o intravenosa). Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también son adecuadas para la administración usando estrategias de administración de fármacos alternativas (véase, por ejemplo, Langer, *Science*, 249: 1527-1533 (1990)).

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral comprenden habitualmente una solución de un anticuerpo monoclonal disuelto en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Pueden usarse una diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3% y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente están libres de materia en forma de partículas. Estas composiciones pueden esterilizarse por técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como ajuste del pH y agentes tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato sódico, etc. La concentración de anticuerpo en estas formulaciones puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente el 0,5%, habitualmente el o al menos aproximadamente el 0,1% hasta el 1,5% o 2,0% en peso, y se seleccionará principalmente basándose en volúmenes de líquido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado. Se conocerán o serán evidentes métodos reales para preparar composiciones administrables por vía parenteral para los expertos en la materia y se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1985), que se incorporan en la presente memoria como referencia.

Las composiciones que contienen los presentes anticuerpos o un cóctel de los mismos pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En la aplicación terapéutica, se administran composiciones a un paciente en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la infección y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso varían generalmente de aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 0,2 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 1,5 mg/kg de peso corporal.

En algunos casos será deseable modificar las moléculas de inmunoglobulina de la invención para cambiar su actividad biológica. Por ejemplo, las inmunoglobulinas pueden acoplarse directa o indirectamente a otros agentes quimioterapéuticos. Pueden acoplarse una diversidad de agentes quimioterapéuticos para su dirección. Por ejemplo, los agentes antiinflamatorios que pueden acoplarse incluyen inmunomoduladores, antagonistas del factor activador de plaquetas (PAF), inhibidores de la ciclooxigenasa, inhibidores de la lipooxigenasa y antagonistas de leucotrienos. Algunos restos preferidos incluyen ciclosporina A, indometacina, naproxeno, FK-506, ácido micofenólico y similares. De forma similar, son útiles antioxidantes, por ejemplo, superóxido dismutasa en el tratamiento de la lesión de reperfusión. Asimismo pueden dirigirse agentes anticancerosos tales como daunomicina, doxorubicina, vinblastina, bleomicina y similares.

Los anticuerpos monoclonales de la invención también pueden usarse para dirigir agentes anfipáticos (por ejemplo, liposomas) a sitios en un paciente. En estas preparaciones, el fármaco a administrar se incorpora como parte un liposoma en el que se incluye un anticuerpo monoclonal humano.

Los anticuerpos monoclonales de secuencia humana de la invención son útiles, en parte, debido a que se unen específicamente al antígeno predeterminado contra el que se dirigen. Cuando el antígeno predeterminado es un antígeno humano (es decir, una proteína humana o fragmento de la misma) a veces será ventajoso si la inmunoglobulina humana de la invención también se une al antígeno afín que se encuentra en animales no humanos, especialmente animales que se usan frecuentemente para el ensayo de fármacos (por ejemplo, ensayo preclínico de la actividad biológica, farmacocinética y seguridad). Estos animales incluyen ratones, conejos, ratas, perros, cerdos y especialmente primates no humanos tales como chimpancés, simios y monos (por ejemplo, monos Rhesus y monos cynomolgus). La capacidad para reconocer antígenos en animales de experimentación es particularmente útil para determinar el efecto de la unión específica sobre la biodistribución de las inmunoglobulinas. Un antígeno afín es un antígeno que (i) tiene una estructura (por ejemplo, secuencia de aminoácidos) que es sustancialmente similar al antígeno humano (es decir, la secuencia de aminoácidos de una proteína afín animal será típicamente al menos aproximadamente el 50% idéntica a la proteína humana, habitualmente al menos aproximadamente el 70% idéntica y con frecuencia al menos aproximadamente el 80% idéntica o más); (ii) tiene sustancialmente la misma función que el antígeno humano; y (iii) con frecuencia se une en el mismo compartimento celular que el antígeno humano. Los antígenos humanos y animal afín típicamente (pero no siempre) tienen los mismos nombres. Los ejemplos de antígenos afines incluyen tubulina humana y tubulina de ratón, CD4 humano y CD4 Rhesus e IgG humana e IgG de rata.

En otro aspecto, la invención proporciona mAb humanos de unión a antígeno que comprenden al menos un polipéptido codificado por un gen artificial. Un gen artificial comprende un segmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido que se sintetiza *in vitro* por métodos químicos o enzimáticos que no requieren una cadena de ácido nucleico de molde derivada de célula (por ejemplo, un molde de ácido nucleico obtenido a partir de una célula bacteriana o una célula inmune o de hibridoma) y la progenie (por replicación) del gen artificial, es decir, un ácido nucleico totalmente sintético.

Aunque es rutinario en la ingeniería genética usar ácidos nucleicos sintéticos cortos como cebadores, engarces y similares, también es posible por medios químicos y/o enzimáticos producir ácidos nucleicos codificantes de proteínas totalmente sintéticos que tengan una longitud de 30, 50 o más bases. Los genes artificiales de la invención pueden incluir tanto regiones de ácido nucleico sintéticas como regiones de ácido nucleico derivadas de célula. La región de ácido nucleico sintética del gen artificial será generalmente de al menos aproximadamente de 50 bases de longitud, con frecuencia de al menos aproximadamente 100 bases, típicamente al menos aproximadamente 200 bases, más frecuentemente al menos aproximadamente 250 bases y habitualmente más de 300 bases o 400 bases de longitud.

Típicamente, las regiones de ácido nucleico sintético codificarán segmentos génicos variables o una porción de los mismos, por ejemplo, regiones CDR, y las regiones constantes estarán codificadas por ácidos nucleicos derivados de células. Los polipéptidos de inmunoglobulina (es decir, cadenas pesadas de inmunoglobulina y cadenas ligeras de inmunoglobulina) pueden expresarse convenientemente usando genes artificiales que codifiquen los polipéptidos. Habitualmente, los genes artificiales se unen operativamente a secuencias promotoras de la transcripción, por ejemplo, secuencias promotoras derivadas de genes de inmunoglobulina o de virus (por ejemplo, SV40, CMV, HIV, RSV) o promotores híbridos. El gen artificial puede unirse a otras secuencias también, por ejemplo, secuencias de poliadenilación e intrones. Un método para expresar un polipéptido de inmunoglobulina implica la inserción de un ácido nucleico sintético que codifica una región de un polipéptido de inmunoglobulina (por ejemplo, una región variable o porción de la misma) en un vector que codifica los segmentos restantes o partes de la cadena de inmunoglobulina (por ejemplo, una región constante μ , γ , $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, δ , ϵ , $\alpha 1$ o $\alpha 2$) y, opcionalmente, secuencias de promotor (por ejemplo, un promotor de CMV (citomegalovirus)), de poliadenilación u otras secuencias. Dichos vectores se construyen de modo que tras la introducción en una célula, la transcripción y traducción celular de las secuencias del vector den como resultado un polipéptido de inmunoglobulina.

Pueden construirse genes y polipéptidos de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina de secuencia humana funcionales usando genes artificiales, y usarse para producir inmunoglobulinas con una especificidad deseada tal como una unión específica a un antígeno predeterminado. Esto se consigue construyendo un gen artificial que codifique un polipéptido de inmunoglobulina sustancialmente similar a un polipéptido expresado por una célula de, o un hibridoma derivado de, un animal transgénico inmunizado con el antígeno predeterminado. Por lo tanto, la invención proporciona genes artificiales que codifican polipéptidos de inmunoglobulina y métodos para producir una inmunoglobulina de secuencia humana usando un gen o genes artificiales.

De acuerdo con este método, un animal transgénico (por ejemplo, un ratón transgénico con un par homocigoto de alelos de cadena pesada endógenos funcionalmente interrumpidos, un par homocigoto de alelos de cadena ligera endógenos funcionalmente interrumpidos, al menos una copia de un transgén de cadena ligera de inmunoglobulina humano y al menos una copia de un transgén de cadena pesada de inmunoglobulina humano) se inmuniza con un antígeno predeterminado, por ejemplo, una proteína humana. Después se recoge o aísla el ácido nucleico, preferiblemente ARNm, de una célula o población de células en las que han tenido lugar reorganizaciones de genes de inmunoglobulina y se determina la secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas ligera y/o pesada (especialmente los segmentos V) de inmunoglobulinas o una porción de las mismas. Esta información de secuencia se usa como base para la secuencia del gen artificial.

La determinación de secuencia requerirá generalmente el aislamiento de al menos una porción del gen o ADNc de interés, por ejemplo, una porción de un transgén humano reorganizado o del ADNc correspondiente que codifica un polipéptido de inmunoglobulina. Habitualmente, esto requiere la clonación del ADN o, preferiblemente, ARNm (es decir, ADNc) que codifica el polipéptido de inmunoglobulina humana. La clonación se lleva a cabo usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, que se incorpora en la presente memoria como referencia). Por ejemplo, una biblioteca de ADNc puede construirse por transcripción inversa de ARNm poliA+, preferiblemente ARNm asociado a membrana, y la biblioteca explorarse usando sondas específicas para secuencia génicas de polipéptidos de inmunoglobulina humana. En una realización preferida, sin embargo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se usa para amplificar ADNc (o porciones de ADNc de longitud completa), que codifican un segmento génico de inmunoglobulina de interés (por ejemplo, un segmento variable de cadena ligera). Debido a que las secuencias de los genes de polipéptidos de inmunoglobulina humana están fácilmente disponibles para los expertos en la materia, pueden diseñarse fácilmente sondas o cebadores de PCR que hibridarán específicamente con o amplificarán un gen de inmunoglobulina humana o segmento del mismo. Véase, por ejemplo, Taylor *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 20: 6287 (1992) que se incorpora como referencia. Además, con frecuencia las secuencias del transgén humano del ratón transgénico serán conocidas para el experto en la materia y pueden seleccionarse secuencias de cebadores que hibriden con regiones apropiadas del transgén. Las secuencias amplificadas pueden clonarse fácilmente en cualquier vector adecuado, por ejemplo, vectores de expresión, vectores de minigenes o vectores de presentación en fago. Se apreciará que el método particular de clonación usado no es crítico siempre que sea posible determinar la secuencia de alguna porción del polipéptido de inmunoglobulina de interés. Como se usa en la presente memoria, un ácido nucleico que se clona, amplifica, marca o distingue de otro modo de ácidos nucleicos de fondo, de modo que pueda determinarse la secuencia del ácido nucleico de interés, se considera aislado.

Una fuente de ARN usado para la clonación y secuenciación es un hibridoma producido por obtención de una célula B del ratón transgénico y fusión de la célula B con una célula inmortal. Una ventaja del uso de hibridomas es que pueden explorarse fácilmente y seleccionarse un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal humano de interés. Como alternativa, el ARN puede aislarse de células B (o de bazo completo) del animal inmunizado. Cuando se usan fuentes distintas de hibridomas, puede ser deseable explorar para secuencias que codifiquen inmunoglobulinas o polipéptidos de inmunoglobulina con características de unión específicas. Un método para dicha exploración es el uso de tecnología de presentación en fago. La presentación en fago se describe en, por ejemplo, Dower *et al.*, documento WO 91/17271, McCafferty *et al.*, documento WO 92/01047 y Caton y Koprowski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6450-6454 (1990), incorporándose cada una de ellas en la presente memoria como referencia. En una realización que usa tecnología de presentación en fago, se aísla ADNc de un ratón transgénico inmunizado (por ejemplo, ADNc de bazo total), se usa la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar una secuencia de ADNc que codifique una porción de polipéptido de inmunoglobulina, por ejemplo, regiones CDR, y las secuencias amplificadas se insertan en

ES 2 345 580 T3

un vector de fago. Se identifican ADNc que codifican péptidos de interés, por ejemplo, péptidos de región variable con características de unión deseadas, mediante técnicas convencionales tales como selección (*panning*).

La secuencia del ácido nucleico amplificado o clonado se determina después. Típicamente, se determina la secuencia que codifica una región variable completa del polipéptido de inmunoglobulina, sin embargo, a veces será adecuado secuenciar sólo una porción de una región variable, por ejemplo, la porción codificante de CDR. Típicamente, la porción secuenciada será de al menos 30 bases de longitud, más frecuentemente se secuenciarán las bases que codifiquen al menos aproximadamente un tercio o al menos aproximadamente la mitad de la longitud de la región variable.

La secuenciación puede llevarse a cabo en clones aislados de una biblioteca de ADNc o, cuando se usa PCR, después de subclonar la secuencia amplificada o por secuenciación directa por PCR del segmento amplificado. La secuenciación se realiza usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, y Sanger, F. *et al.* (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467, que se incorporan en la presente memoria como referencia). Por comparación de la secuencia del ácido nucleico clonado con secuencias publicadas de genes de inmunoglobulina humanos y ADNc, un experto será fácilmente capaz de determinar, dependiendo de la región secuenciada, (i) el uso de segmentos de la línea germinal del polipéptido de inmunoglobulina de hibridoma (incluyendo el isotipo de la cadena pesada) y (ii) la secuencia de las regiones variables de cadena ligera y pesada incluyendo las secuencias resultantes de la adición de región N y el proceso de mutación somática. Una fuente de información de secuencia de genes de inmunoglobulina es el National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md.

En una realización alternativa, la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina de interés puede determinarse por secuenciación directa de proteínas.

Puede construirse un gen artificial que tenga una secuencia idéntica a o sustancialmente similar a al menos una porción del gen de expresión de inmunoglobulina (es decir, transgén reorganizado). De forma similar, el gen artificial puede codificar un polipéptido que sea idéntico o tenga una similitud sustancial con un polipéptido codificado por la porción secuenciada del transgén reorganizado. La degeneración del código genético permite que el mismo polipéptido esté codificado por múltiples secuencias de ácido nucleico. A veces es deseable cambiar la secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, introducir sitios de restricción, cambiar el uso de codones para reflejar un sistema de expresión particular o eliminar un sitio de glicosilación. Además, pueden introducirse cambios en las secuencias del hibridoma para cambiar las características (por ejemplo, características de unión) de la inmunoglobulina. Por ejemplo, pueden producirse cambios, especialmente en las regiones CDR de las regiones variables de cadena ligera y pesada, para aumentar la afinidad de la inmunoglobulina por el antígeno predeterminado.

Son bien conocidos métodos para construir un ácido nucleico sintético. Es posible una síntesis totalmente química pero, en general, se lleva a cabo una síntesis química-enzimática mixta en la que se usan oligonucleótidos sintetizados químicamente en reacciones de ligación y/o en la reacción en cadena de la polimerasa para crear polinucleótidos más largos. En una realización más preferida, la reacción en cadena de la polimerasa se lleva a cabo usando cebadores soportados seleccionados de modo que el resultado de la amplificación sea un ADN con la secuencia deseada para el gen artificial. Los oligonucleótidos de la presente invención pueden sintetizarse en fase sólida o en solución. Generalmente, se prefiere síntesis en fase sólida. Están ampliamente disponibles descripciones detalladas de los procedimientos para síntesis en fase sólida de oligonucleótidos mediante químicas de fosfito-triéster, fosfotriéster y H-fosfonato. Véase, por ejemplo, Itakura, Patente de Estados Unidos N° 4.401.796; Caruthers *et al.*, Patentes de Estados Unidos N° 4.458.066 y 4.500.707; Beaucage *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 22: 1859-1862; Matteucci *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 103: 3185-3191 (1981); Caruthers *et al.*, *Genetic Engineering*, 4: 1-17 (1982); Jones, capítulo 2, Atkinson *et al.*, capítulo 3, y Sproat *et al.*, capítulo 4, en Gait, ed. *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1984); Froehler *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 27: 469-472 (1986); Froehler *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 14: 5399-5407 (1986); Sinha *et al.* *Tetrahedron Lett.*, 24: 5843-5846 (1983); y Sinha *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 12: 4539-4557 (1984), que se incorporan en la presente memoria como referencia.

El gen artificial puede introducirse en una célula y expresarse para producir un polipéptido de inmunoglobulina. La elección del tipo celular para la expresión dependerá de muchos factores (por ejemplo, el nivel de glicosilación de proteína deseado), pero se preferirán células capaces de secretar inmunoglobulinas humanas. Las células especialmente preferidas incluyen células CHO y células derivadas de mieloma tales como las líneas celulares SP20 y NSO. El cultivo de células convencional es bien conocido y también se describe en Newman, *et al.* *Biotechnology*, 10: 1455-1460 (1992); Bebbington, *et al.* *Biotechnology*, 10: 169-175 (1992); Cockett, *et al.* *Biotechnology*, 8: 662-667(1990); Carter, *et al.* *Biotechnology*, 10: 163-167(1992), incorporándose cada uno de ellos en la presente memoria como referencia. Son bien conocidos métodos para la introducción de ácidos nucleicos, por ejemplo, un gen artificial e incluyen transfección (por ejemplo, por electroporación o mediada por liposomas) y transformación. Se describen en general sistemas para la expresión de genes introducidos en Sambrook *et al.*, anteriormente.

Con frecuencia es deseable expresar dos polipéptidos de inmunoglobulina (es decir, una cadena pesada y una cadena ligera) en la misma célula, de modo que se produzca una inmunoglobulina (por ejemplo, una molécula de IgG) *in vivo*. Por consiguiente, a veces será deseable introducir dos genes artificiales (es decir, uno que codifique una cadena pesada y uno que codifique una cadena ligera) en una célula. (Los dos genes artificiales pueden introducirse en un solo vector). Como alternativa, un gen artificial que codifica un polipéptido de inmunoglobulina puede introducirse en una célula que se ha modificado por ingeniería genética para que exprese el otro polipéptido de inmunoglobulina.

Será evidente que a medida que se propagan las células en las que se transfecta el gen artificial, la porción de ácido nucleico totalmente sintética del gen artificial actuará como molde para la replicación y la transcripción. No obstante, los genes de la progenie se habrán originado a partir de un ácido nucleico sintético (es decir, una molécula de ácido nucleico codificante de un polipéptido que se sintetiza *in vitro* por métodos químicos o enzimáticos que no requieren una cadena de ácido nucleico de molde derivada de célula) y, como se usan en la presente memoria, también se consideran genes artificiales. Por lo tanto, la relación de la porción sintética del gen artificial respecto al transgén expresado del hibridoma es una en la que existe una conexión de *información* (es decir, información de secuencia) pero no una conexión *física* directa.

La invención también proporciona anticuerpos monoclonales anti-CD4 útiles en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico, especialmente el tratamiento de una enfermedad humana. CD4 es una proteína de superficie celular que se expresa principalmente en timocitos y células T y que está implicada en la función de células T y el reconocimiento de antígenos de MHC Clase II. Los anticuerpos dirigidos contra CD4 actúan reduciendo la actividad de células CD4 y, así, reducen reacciones autoinmunes indeseables, respuestas inflamatorias y rechazo de órganos trasplantados.

De hecho, se ha demostrado que la administración de mAb anti-CD4 previene (Wofsy, *et al.*, J. Exp. Med., 161: 378-391 (1985)) o revierte (Wofsy, *et al.*, J. Immunol., 138: 3247-3253 (1987), Waldor, *et al.* Science, 227: 415-417 (1985)) enfermedades autoinmunes en modelos animales. La administración de mAb anti-CD4 murinos o quiméricos a pacientes con artritis reumatoide ha demostrado pruebas de beneficio clínico (Knox, *et al.* Blood, 77: 20-30 (1991); Goldbery, *et al.*, J. Autoimmunity, 4: 617-630; Herzog, *et al.* Lancet, ii: 1461-1462; Horneff, *et al.* Arthritis Rheum, 34: 129-140; Reiter, *et al.* Arthritis Rheum, 34: 525-536; Wending, *et al.*, J. Rheum, 18: 325-327; Van der Lubbe, *et al.* Arthritis Rheum, 38: 1097-1106; Van der Lubbe, *et al.* Arthritis Rheum, 36: 1375-1379; Moreland, *et al.*, Arthritis Rheum, 36: 307-318 y Choy, *et al.*, Arthritis and Rheumatism, 39(1): 52-56 (1996); incorporándose todos ellos en la presente memoria como referencia). Además, como se ha señalado anteriormente, un mAb anti-CD4 quimérico ha demostrado cierta eficacia clínica en pacientes con micosis fungoide (Knox *et al.* (1991) Blood 77: 20; que se incorpora en la presente memoria como referencia). También se analizan anticuerpos anti-CD4 en Newman, *et al.*, Biotechnology, 10: 1455-1460 (1992), que se incorpora en la presente memoria como referencia.

Ejemplos experimentales

Materiales y métodos

Los ratones transgénicos se obtienen de acuerdo con Hogan, *et al.*, "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, que se incorpora en la presente memoria como referencia.

Las células madre embrionarias se manipulan de acuerdo con procedimientos publicados (Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach, E. J. Robertson, ed, IRL Press, Washington, D. C, 1987; Zijlstra *et al.* Nature 342: 435-438 (1989); y Schwartzbergetal, Science 246: 799-803 (1989), incorporándose cada una de ellas en la presente memoria como referencia).

Los procedimientos de clonación de ADN se llevan a cabo de acuerdo con J. Sambrook, *et al.* en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., que se incorporan en la presente memoria como referencia.

Los oligonucleótidos se sintetizan en un sintetizador de oligonucleótidos Applied Bio Systems de acuerdo con las especificaciones proporcionadas por el fabricante. Las células de hibridoma y los anticuerpos se manipulan de acuerdo con "Antibodies: A Laboratory Manual", Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), que se incorporan en la presente memoria como referencia.

Ejemplo 1

Transgén de Ig Humana de Cadena Pesada Genómico

Este Ejemplo describe la clonación y microinyección de un transgén de inmunoglobulina de cadena pesada genómico humano que se microinyecta en un cigoto murino.

Se aíslan núcleos de tejido placentario humano recién obtenido como se describe por Marzluff *et al.*, "Transcription and Translation: A Practical Approach", B. D. Hammes y S. J. Higgins, eds, págs. 89-129, IRL-Press, Oxford (1985). Los núcleos aislados (o espermatozoides humanos lavados con PBS) se embeben en una matriz de agarosa de bajo punto de fusión y se lisan con EDTA y proteinasa κ para exponer el ADN de alto peso molecular, que después se digiere en la agarosa con la enzima de restricción NotI como se describe por M. Finney en Current Protocols in Molecular Biology (F. Ausubel, *et al.*, eds. John Wiley & Sons, Sup. 4, 1988, Sección 2.5.1).

El ADN digerido con NotI se fracciona después por electroforesis en gel de campo pulsado, como se describe por Anand *et al.*, Nucl. Acids Res. 17: 3425-3433 (1989). Las fracciones enriquecidas para el fragmento NotI se

ES 2 345 580 T3

- ensayan mediante hibridación de Southern para detectar una o más de las secuencias codificadas por este fragmento. Dichas secuencias incluyen los segmentos D de cadena pesada, segmentos J, regiones constantes μ y $\gamma 1$, junto con representantes de las 6 familias de VH (aunque este fragmento se identifica como un fragmento de 670 kb de células HeLa por Berman *et al.* (1988), anteriormente, se ha descubierto que es un fragmento de 830 kb de ADN de esperma y placenta humana). Las fracciones que contienen este fragmento NotI (véase la Figura 4) se combinan y se clonan en el sitio NotI del vector pYACNN en células de levadura. Se prepara el plásmido pYACNN por digestión de pYAC-4 Neo (Cook *et al.*, Nucleic Acids Res. 16: 11817 (1988)) con EcoRI y ligación en presencia del oligonucleótido 5'-AAT TGC GGC CGC-3' (SEC ID N°: 35).
- Se aíslan clones de YAC que contienen el fragmento NotI de cadena pesada como se describe por Brownstein *et al.*, Science 244: 1348-1351 (1989) y Green *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1213-1217 (1990), que se incorporan en la presente memoria como referencia. El inserto NotI clonado se aísla a partir de ADN de levadura de alto peso molecular mediante electroforesis en gel de campo pulsado, como se describe por M. Finney, en la obra citada. El ADN se condensa por adición de espermina 1 mM y se microinyecta directamente en el núcleo de los embriones de una sola célula descritos anteriormente.

Ejemplo 2

20 *Transgén de Ig Humana de Cadena Ligera κ Genómico Formado por Recombinación Homóloga In Vivo*

Se ha descrito un mapa de la cadena ligera κ humana en Lorenz *et al.*, Nucl. Acids Res. 15: 9667-9677 (1987), que se incorpora en la presente memoria como referencia.

- Un fragmento de XhoI a NotI de 450 kb, que incluye toda la C_{κ} , el potenciador 3', todos los segmentos J y al menos cinco segmentos V diferentes, se aísla y se microinyecta en el núcleo de embriones de una sola célula como se describe en el Ejemplo 1.

30 Ejemplo 3

Transgén de Ig Humana de Cadena Ligera κ Genómico Formado por Recombinación Homóloga In Vivo

- Un fragmento de MluI a NotI de 750 kb, que incluye todo lo anterior más al menos 20 segmentos V más, se aísla como se describe en el Ejemplo 1 y se digiere con BssHII para producir un fragmento de aproximadamente 400 kb.

- El fragmento de XhoI a NotI de 450 kb más el fragmento de MluI a BssHII de aproximadamente 400 kb tienen un solapamiento de secuencia definido por los sitios de restricción BssHII y XhoI. La recombinación homóloga de estos dos fragmentos tras la microinyección de un cigoto de ratón da como resultado un transgén que contiene al menos 15-20 segmentos V adicionales más de los encontrados en el fragmento XhoI/NotI de 450 kb (Ejemplo 2).

Ejemplo 4

45 *Construcción de Minilocus de Cadena Pesada*

A. Construcción de pGP1 y pGP2

- Se digiere el pBR322 con EcoRI y StyI y se liga con los oligonucleótidos siguientes para generar pGP1, que contiene un inserto de 147 pares de bases que contiene los sitios de restricción que se muestran en la Figura 8. El solapamiento general de estos oligonucleótidos también se muestra en la Figura 9.

Los oligonucleótidos son:

- oligo-1 5'
- CTT GAG CCC GCC TAA TGA GCG GGC TTT
TTT TTG CAT ACT GCG GCC - 3' (SEC ID N°: 26)
- oligo-2 5'
- GCA ATG GCC TGG ATC CAT GGC GCG CTA
GCA TCG ATA TCT AGA GCT CGA GCA - 3' (SEC ID N°: 27)

ES 2 345 580 T3

oligo-3 5'

- TGC AGA TCT GAA TTC CCG GGT ACC AAG
CTT ACG CGT ACT AGT GCG GCC GCT - 3' (SEC ID N°: 28)

oligo-4 5'

- AAT TAG CGG CCG CAC TAG TAC GCG TAA
GCT TGG TAC CCG GGA ATT - 3' (SEC ID N°: 29)

oligo-5 5'

- CAG ATC TGC ATG CTC GAG CTC TAG ATA
TCG ATG CTA GCG CGC CAT GGA TCC - 3' (SEC ID N°: 30)

oligo-6 5'

- AGG CCA TTG CGG CCG CAG TAT GCA AAA
AAA AGC CCG CTC ATT AGG CGG GCT - 3' (SEC ID N°: 31)

Este plásmido contiene un polienlazador de gran tamaño flanqueado por sitios NotI de corte poco frecuente para construir insertos de gran tamaño que pueden aislarse a partir de secuencias de vector para su microinyección. El plásmido se basa en pBR322, que tiene un número de copias relativamente bajo en comparación con los plásmidos basados en pUC (pGP1 conserva la región de control del número de copias de pBR322 próxima al origen de replicación). El bajo número de copias reduce la toxicidad potencial de las secuencias de insertos. Además, el pGP1 contiene una secuencia de terminación de la transcripción potente derivada de *trpA* (Christie *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4180 (1981)) insertada entre el gen de resistencia a ampicilina y el polienlazador. Esto reduce adicionalmente la toxicidad asociada con ciertos insertos evitando la transcripción por translectura que procede de los promotores de ampicilina.

El plásmido pGP2 se obtiene a partir de pGP1 introduciendo un sitio de restricción adicional (SfiI) en el polienlazador. El pGP1 se digiere con MluI y SpeI para cortar las secuencias de reconocimiento en la porción polienlazadora del plásmido.

Los oligonucleótidos adaptadores siguientes se ligan al pGP1 así digerido para formar pGP2.

5' CGC GTG GCC GCA ATG GCC A 3' (SEC ID N°: 32)

5' CTA GTG GCC ATT GCG GCC A 3' (SEC ID N°: 33)

El pGP2 es idéntico al pGP1 excepto por que contiene un sitio SfiI adicional localizado entre los sitios MluI y SpeI. Esto permite que los insertos se escindan completamente con SfiI, así como con NotI.

B. Construcción de *pRE3* (potenciador de rata 3')

Una secuencia de potenciador localizada cadena bajo de la región constante de ratas se incluye en las construcciones de cadena pesada.

El potenciador 3' de región de cadena pesada descrito por Petterson *et al.*, *Nature* 344: 165-168 (1990), que se incorpora en la presente memoria como referencia, se aísla y se clona. La secuencia de potenciador 3' de IGH de rata se amplifica por PCR mediante el uso de los oligonucleótidos siguientes:

5' CAG GAT CCA GAT ATC AGT ACC TGA AAC AGG GCT TGC 3' (SEC ID N°:
34)

5' GAG CAT GCA CAG GAC CTG GAG CAC ACA CAG CCT TCC 3' (SEC ID
N°: 35)

ES 2 345 580 T3

El ADN bicatenario así formado que codifica el potenciador 3' se corta con BamHI y SphI y se clona en pGP2 cortado con BamHI/SphI para dar pRE3 (potenciador de rata 3').

5 C. Clonación de Región J- μ Humana

Una porción sustancial de esta región se clona combinando dos o más fragmentos aislados de insertos de fago lambda. Véase la Figura 9.

10 Un fragmento BamHI/HindIII de 6,3 kb que incluye todos los segmentos J humanos (Matsuda *et al.*, EMBO J., 7: 047-1051 (1988); Ravetch *et al.*, Cell, 27: 583-591 (1981), que se incorporan en la presente memoria como referencia) se aísla a partir de una biblioteca de ADN genómico usando el oligonucleótido GGA CTG TGT CCC TGT GTG ATG CTT TTG ATG TCT GGG GCC AAG (SEC ID N°: 36).

15 Un fragmento HindIII/BamII de 10 kb adyacente que contiene un potenciador, exones codificantes de región constante y de cambio (Yasui *et al.*, Eur. J. Immunol. 19: 1399-1403 (1989)) se aísla de forma similar usando el oligonucleótido:

20 CAC CAA GTT GAC CTG CCT GGT CAC AGA CCT GAC CAC CTA TGA (SEC ID N°: 37).

25 Un fragmento BamHI de 1,5 kb 3' adyacente se aísla de forma similar usando el inserto del clon pMUM como sonda (pMUM es un fragmento EcoRI/HindIII de 4 kb aislado de una biblioteca de ADN genómico humano con el oligonucleótido:

30 CCT GTG GAC CAC CGC CTC CAC CTT CAT
CGT CCT CTT CCT CCT

de exón 1 de mu de membrana) y se clona en pUC19.

35 El pGP1 se digiere con BamHI y BglII, seguido de tratamiento con fosfatasa alcalina intestinal de ternera.

40 Los fragmentos (a) y (b) de la Figura 9 se clonan en el pPG1 digerido. Después, se aísla un clon que se orienta de modo que se destruye el sitio BamHI 5' por fusión BamHI/BglI. Se identifica como pMU (véase la Figura 10). El pMU se digiere con BamHI y se inserta el fragmento (c) de la Figura 9. La orientación se comprueba con digestión con HindIII. El plásmido resultante pHIG1 (Figura 10) contiene un inserto de 18 kb que codifica segmentos J y C μ .

D. Clonación de Región C μ

45 El pGP1 se digiere con BamHI y HindIII y se sigue del tratamiento con fosfatasa alcalina intestinal de ternera (Figura 14). El fragmento así tratado (b) de la Figura 14 y el fragmento (c) de la Figura 14 se clonan en el pGP1 cortado con BamHI/HindIII. Se comprueba la orientación apropiada del fragmento (c) por digestión con HindIII para formar pCON1 que contiene un inserto de 12 kb que codifica la región C μ .

50 Considerando que pHIG1 contiene segmentos J, secuencias de cambio y μ en su inserto de 18 kb con un sitio SfiI 3' y un sitio SpeI 5' en un polienlazador flanqueado por sitios NotI, se usará para segmentos VDJ reorganizados. El pCON1 es idéntico excepto por que carece de la región J y contiene sólo un inserto de 12 kb. El uso de pCON1 en la construcción de un fragmento que contiene segmentos VDJ reorganizados se describirá a continuación en la presente memoria.

55

E. Clonación de Reacción Constante γ -1 (pREG2)

60 La clonación de la región γ -1 se representa en la Figura 16.

Yamamura *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2152-2156 (1986) describieron la expresión de γ -1 humana unida a membrana a partir de una construcción transgénica que se había delecionado parcialmente en la integración. Sus resultados indican que el sitio BamHI 3' delinea una secuencia que incluye la copia reorganizada y cambiada transmembrana del gen gamma con un intrón V-C de menos 5 kb. Por lo tanto, en el gen no reorganizado no cambiado, 65 la región de cambio completa se incluye en una secuencia que comienza a menos de 5 kb del extremo 5' del primer exón constante γ -1. Por lo tanto, se incluye en el fragmento HindIII de 5,3 kb 5' (Ellison *et al.*, Nucleic Acids Res. 10: 4071-4079 (1982), que se incorpora en la presente memoria como referencia). Takahashi *et al.*, Cell 29: 671-679

ES 2 345 580 T3

(1982), que se incorpora en la presente memoria como referencia, también describe que este fragmento contiene la secuencia de cambio y este fragmento junto con el fragmento de HindIII a BamHI de 7,7 kb debe incluir todas las secuencias necesarias para la construcción del transgén. Una secuencia intrónica es una secuencia de nucleótidos de al menos 15 nucleótidos contiguos que aparece en un intrón de un gen específico.

Se identifican clones de fagos que contienen la región γ -1 y se aíslan usando el oligonucleótido siguiente que es específico para el tercer exón de γ -1 (CH3).

5' TGA GCC ACG AAG ACC CTG AGG

TCA AGT TCA ACT GGT ACG TGG 3' (SEC ID N°: 39)

Un fragmento de HindIII a BglII de 7,7 (fragmento (a) en la Figura 11) se clona en pRE3 cortado con HindIII/BglII para formar pREG1. El fragmento HindIII de 5,3 kb cadena arriba (fragmento (b) en la Figura 11) se clona en pREG1 digerido con HindIII para formar pREG2. La orientación correcta se confirma por digestión como BamHI/SpeI.

F. Combinación de $C\gamma$ y $C\mu$

El plásmido descrito anteriormente pHIG1 contiene segmentos J humanos y los exones de región constante $C\mu$. Para proporcionar un transgén que contiene los segmentos génicos de la región constante $C\mu$, se digirió pHIG1 con SfiI (Figura 10). El plásmido pREG2 también se digirió con SfiI para producir un inserto de 13,5 kb que contiene exones $C\gamma$ humanos y la secuencia del potenciador 3' de rata. Estas secuencias se combinaron para producir el plásmido pHIG3' (Figura 12) que contiene los segmentos J humanos, la región constante $C\mu$ humana, la región constante $C\gamma$ humana y el potenciador 3' de rata contenido en un inserto de 31,5 kb.

Un segundo plásmido que codifica $C\mu$ humana y $C\gamma$ sin segmentos J se construye por digestión de pCON1 con SfiI y combinación del mismo con el fragmento SfiI que contiene la región $C\gamma$ humana y el potenciador 3' de rata por digestión de pREG2 con SfiI. El plásmido resultante, pCON (Figura 12) contiene un inserto NotI/SpeI de 26 kb que contiene $C\mu$ humana, γ 1 humana y la secuencia del potenciador 3' de rata.

G. Clonación de Segmento D

La estrategia para clonar los segmentos D humanos se representa en la Figura 13. Se identifican clones de fagos de la biblioteca genómica humana que contienen segmentos D y se aíslan usando sondas específicas para secuencias de la región de diversidad (Ichihara *et al.*, EMBO J. 7: 4141-4150 (1988)). Se usan los oligonucleótidos siguientes:

DXP1:

5' - TGG TAT TAC TAT GGT TCG GGG AGT TAT TAT
AAC CAC AGT GTC - 3' (SEC ID N°: 40)

DXP4:

5' - GCC TGA AAT GGA GCC TCA GGG CAC AGT GGG
CAC GGA CAC TGT - 3' (SEC ID N°: 41)

DN4:

5' - GCA GGG AGG ACA TGT TTA GGA TCT GAG GCC
GCA CCT GAC ACC - 3' (SEC ID N°: 42)

Un fragmento XhoI de 5,2 kb (fragmento (b) en la Figura 13) que contiene DLR1, DXP1, DXP'1 y DA1 se aísla de un clon de fago identificado con el oligonucleótido DXP1.

Un fragmento de XbaI de 3,2 kb (fragmento (c) en la Figura 13) que contiene DXP4, DA4 y DK4 se aísla a partir de un clon de fago identificado con el oligonucleótido DXP4.

Los fragmentos (b), (c) y (d) de la Figura 13 se combinan y se clonan en el sitio XbaI/XhoI de pGP1 para formar pHIG2, que contiene un inserto de 10,6 kb.

Esta clonación se realiza de forma secuencial. En primer lugar, el fragmento de 5,2 kb (b) en la Figura 13 y el fragmento de 2,2 kb (d) de la Figura 13 se tratan con fosfatasa alcalina intestinal de ternera y se clonan en pGP1 digerido con XhoI y XbaI. Los clones resultantes se exploran con el inserto de 5,2 y de 2,2 kb. La mitad de esos

ES 2 345 580 T3

clones que dan un resultado positivo en el ensayo con los insertos de 5,2 y 2,2 kb tienen el inserto de 5,2 kb en la orientación apropiada, según se determina por digestión con BamHI. El fragmento XbaI de 3,2 kb de la Figura 13 se clona después en este plásmido intermedio que contiene los fragmentos (b) y (d) para formar pHIG2. Este plásmido contiene segmentos de diversidad clonados en el polienlazador con un sitio SfiI 5' único y un sitio SpeI 3' único. El polienlazador completo está flanqueado por sitios NotI.

H. Construcción de Minilocus de Cadena Pesada

Lo siguiente describe la construcción de un minilocus de cadena pesada humana que contiene uno o más segmentos V.

Un segmento V no reorganizado correspondiente al identificado como segmento V contenido en el hibridoma de Newkirk *et al.*, J. Clin. Invest. 81: 1511-1518 (1988), que se incorpora en la presente como referencia, se aísla usando el oligonucleótido siguiente:

5' - GAT CCT GGT TTA GTT AAA GAG GAT TTT

ATT CAC CCC TGT GTC - 3' (SEC ID N°: 43)

Se determina un mapa de restricción del segmento V no reorganizado para identificar sitios de restricción únicos que proporcionen tras la digestión un fragmento de ADN que tiene una longitud de aproximadamente 2 kb que contiene el segmento V no reorganizado junto con secuencias flanqueantes 5' y 3'. Las secuencias 5' prima incluirán un promotor y otras secuencias reguladoras mientras que la secuencia flanqueante 3' proporciona secuencias de recombinación necesarias para la unión V-DJ. Este inserto de segmento V de aproximadamente 3,0 kb se clona en el polienlazador de pGB2 para formar pVH1.

pVH1 se digiere con SfiI y el fragmento resultante se clona en el sitio SfiI de pHIG2 para formar un pHIG5'. Puesto que pHIG2 contiene segmentos D solamente, el plásmido pHIG5' resultante contiene un solo segmento V junto con segmentos D. El tamaño del inserto contenido en pHIG5 es de 10,6 kb más el tamaño del inserto de segmento V.

El inserto de pHIG5 se escinde por digestión con NotI y SpeI y se aísla. El pHIG3' que contiene segmentos J, C μ y γ 1, se digiere con SpeI y NotI y el fragmento de kb 3' que contiene dichas secuencias y la secuencia del potenciador 3' de rata se aísla. Estos dos fragmentos se combinan y se ligan en pGP1 digerido con NotI para producir pHIG, que contiene un inserto que codifica un segmento V, nueve segmentos D, seis segmentos J funcionales, C μ , C γ y el potenciador 3' de rata. El tamaño de este inserto es de aproximadamente 43 kb más el tamaño del inserto de segmento V.

I. Construcción de Minilocus de Cadena Pesada por Recombinación Homóloga

Como se ha indicado en la sección anterior, el inserto de pHIG es de aproximadamente 43 a 45 kb cuando se emplea un solo segmento V. Este tamaño de inserto está en el límite o próximo al límite del que puede clonarse fácilmente en vectores plasmídicos. Para proporcionar el uso de un mayor número de segmentos V, lo siguiente describe recombinación homóloga *in vivo* de fragmentos de ADN solapantes que tras la recombinación homóloga dentro de un cigoto o célula ES forman un transgén que contiene la secuencia del potenciador 3' de rata, la C μ humana, la C γ 1 humana, segmentos J humanos, segmentos D humanos y una multiplicidad de segmentos V humanos.

Un fragmento BamHI/HindIII de 6,3 kb que contiene segmentos J humanos (véase el fragmento (a) en la Figura 9) se clona en pHIG5' digerido con MluI/SpeI usando los adaptadores siguientes:

5' GAT CCA AGC AGT 3' (SEC ID N°: 44)

5' CTA GAC TGC TTG 3' (SEC ID N°: 45)

5' CGC GTC GAA CTA 3' (SEC ID N°: 46)

5' AGC TTA GTT CGA 3' (SEC ID N°: 47)

Lo resultante es el plásmido denominado pHIG5'O (solapamiento). El inserto contenido en este plásmido contiene segmentos V, D y J humanos. Cuando se usa el único segmento V de pVH1, el tamaño de este inserto es de aproximadamente 17 kb más 2 kb. Este inserto se aísla y se combina con el inserto del pHIG3', que contiene las secuencias J, C μ , γ 1 humanas y del potenciador 3' de rata. Ambos insertos contienen segmentos J humanos que proporcionan aproximadamente 6,3 kb de solapamiento entre los dos fragmentos de ADN. Cuando se coinyectan en el cigoto de ratón, se produce una recombinación homóloga *in vivo* que genera un transgén equivalente al inserto contenido en pHIG.

ES 2 345 580 T3

Esta estrategia proporciona la adición de una multiplicidad de segmentos V en el transgén formado *in vivo*. Por ejemplo, en lugar de incorporar un solo segmento V en pHIG5', una multiplicidad de segmentos V contenidos en (1) ADN genómico aislado, (2) ADN ligado derivado de ADN genómico o (3) ADN que codifica un repertorio de segmentos V sintéticos se clonan en pHIG2 en el sitio SfiI para generar el pHIG5' V_N. El fragmento de segmentos J (a) de la Figura 9 se clona después en el pHIG5' y se aísla el inserto. Este inserto contiene ahora una multiplicidad de segmentos V y segmentos J que solapan con los segmentos J contenidos en el inserto aislado del pHIG3'. Cuando se reintroducen en el núcleo de un cigoto de ratón, se produce una recombinación homóloga para generar *in vivo* el transgén que codifica múltiples segmentos V y múltiples segmentos J, múltiples segmentos D, la región C_μ, la región C_{γ1} (todos de ser humano) y la secuencia del potenciador 3' de rata.

Ejemplo 5

Construcción de Minilocus de Cadena Ligera

A. Construcción de pE_μ1

La construcción de pE_μ1 se representa en la Figura 16. El potenciador de cadena pesada de ratón se aísla en el fragmento de 678 pb de XbaI a EcoRI (Banerji *et al.*, Cell 33: 729-740 (1983)) de los clones de fago usando el oligonucleótido:

5' GAA TGG GAG TGA GGC TCT CTC ATA CCC
TAT TCA GAA CTG ACT 3' (SEC ID N°: 48)

Este fragmento E_μ se clona en el pGP1 digerido con EcoRV/XbaI por rellenado de extremos romos en el sitio EcoRI. El plásmido resultante se denomina pE_μ1.

B. Construcción de Minilocus de Cadena Ligera κ

La construcción κ contiene al menos un segmento V_κ humano, los cinco segmentos J_κ humanos, el potenciador J-C_κ humano, el exón de la región constante κ humana e, idealmente, el potenciador κ 3' humano (Meyer *et al.*, EMBO J. 8: 1959-1964 (1989)). El potenciador κ en ratón está 9 kb cadena abajo de C_κ. Sin embargo, todavía no se ha identificado en el ser humano. Además, la construcción contiene una copia de los potenciadores J-C_μ de cadena pesada de ratón.

El minilocus se construye a partir de cuatro fragmentos componentes:

- (a) un fragmento SmaI de 16 kb que contiene el exón C_κ humano y el potenciador humano 3' por analogía con el locus de ratón;
- (b) un fragmento es SmaI de 5 kb adyacente a 5' que contiene los cinco segmentos J;
- (c) el potenciador intrónico de cadena pesada de ratón aislado de pE_μ1 (esta secuencia se incluye para inducir la expresión de la construcción de cadena ligera tan pronto como sea posible en el desarrollo de células B. Debido a que los genes de cadena pesada se transcriben antes que los genes de cadena ligera, este potenciador de cadena pesada es presumiblemente activo en una fase más temprana que el potenciador κ intrónico); y
- (d) un fragmento que contiene uno o más segmentos V.

La preparación de esta construcción es de la forma siguiente. Se digiere ADN placentario humano con SmaI y se fraccionan en gel de agarosa por electroforesis. De forma similar, se digiere ADN placentario humano con BamHI y se fracciona por electroforesis. La fracción de 16 kb se aísla del gel digerido con SmaI y la región de 11 kb se aísla de forma similar a partir del gel que contiene ADN digerido con BamHI.

La fracción SmaI de 16 kb se clona en Lambda FIX II (Stratagene, La Jolla, California), que se ha digerido con XhoI, tratado con fragmento klenow de ADN polimerasa para rellenar el producto de la digestión de restricción con XhoI. La ligación de la fracción SmaI de 16 kb destruye los sitios SmaI y deja intactos los sitios XhoI.

La fracción BamHI de 11 kb se clona en λ EMBL3 (Stratagene, La Jolla, California), que se digiere con BamHI antes de la clonación.

Los clones de cada biblioteca se sondaron con el oligonucleótido específico de C_κ:

5' GAA CTG TGG CTG CAC CAT CTG TCT
TCA TCT TCC CGC CAT CTG 3' (SEC ID N°: 49)

ES 2 345 580 T3

Un inserto XhoI 16 kb que se subclonó en el pE μ 1 cortado con XhoI de modo que C κ sea adyacente al sitio SmaI. El plásmido resultante se denominó pKap1.

5 El oligonucleótido específico de C κ anterior se usa para sondear la biblioteca λ EMBL3/BamHI para identificar un clon de 11 kb. Se subclona un fragmento SmaI de 5 kb (fragmento (b) en la Figura 20) y posteriormente se inserta en pKap1 digerido con SmaI. Los plásmidos que contienen la orientación correcta de segmentos J, C κ y el potenciador E μ se denominan pKap2.

10 Uno o más segmentos V κ se subclonan después de eso en el sitio MluI de pKap2 para dar el plásmido pKapH que codifica los segmentos V κ humanos; los segmentos J κ humanos, los segmentos C κ humanos y el potenciador E μ humano. Este inserto se escinde por digestión de pKapH con NotI y se purifica mediante electroforesis en gel de agarosa. El inserto así purificado se microinyecta en el pronúcleo de un cigoto de ratón como se ha descrito anteriormente.

15 C. Construcción de Minilocus de Cadena Ligera κ por Recombinación Homóloga *In Vivo*

El fragmento BamHI de 11 kb se clona en el pGP1 digerido con BamHI de modo que el extremo 3' esté hacia el sitio SfiI. El plásmido resultante se denomina pKAPint. Uno o más segmentos V κ se insertan en el polienlazador entre los sitios BamHI y SpeI en pKAPint para formar pKappHV. El inserto de pKappHV se escinde por digestión con NotI y se purifica. El inserto de pKap2 se escinde por digestión con NotI y se purifica. Cada uno de estos fragmentos
20 contiene regiones de homología en el sentido de que el fragmento de pKappHV contiene una secuencia de ADN de 5 kb que incluye los segmentos J κ que es sustancialmente homóloga al fragmento SmaI de 5 kb contenido en el inserto obtenido de pKap2. Como tales, estos insertos son capaces de experimentar una recombinación homóloga cuando se microinyectan en un cigoto de ratón para formar un transgén que codifica V κ , J κ y C κ .

25 Ejemplo 6

Aislamiento de Clones Genómicos Correspondientes a Copias Reorganizadas y Expresadas de Genes de Cadena Ligera κ de Inmunoglobulina

30 Este ejemplo describe la clonación de genes de cadena ligera κ de inmunoglobulina a partir de células cultivadas que expresan una inmunoglobulina de interés. Dichas células pueden contener múltiples alelos de un gen de inmunoglobulina dado. Por ejemplo, un hibridoma podría contener cuatro copias del gen de cadena ligera κ , dos copias de la línea celular del compañero de fusión y dos copias de la célula B original que expresa la inmunoglobulina de interés. De estas cuatro copias, sólo una codifica la inmunoglobulina de interés, a pesar del hecho de que pueden estar reorganizadas varias de ellas. El procedimiento descrito en este ejemplo permite la clonación selectiva de la copia expresada de la cadena ligera κ .

40 A. ADNc Bicatenario

Se usan células de hibridoma humano, o linfoma, u otra línea celular que sintetice formas de superficie celular o secretadas o ambas de IgM con una cadena ligera κ , para el aislamiento de ARN poliA+. El ARN se usa después para la síntesis de ADNc cebado con oligo dT usando la enzima transcriptasa inversa (para métodos generales véase, Goodspeed *et al.* (1989) Gene 76: 1; Dunn *et al.* (1989) J. Biol. Chem. 264: 13057). Después, se aísla el ADNc
45 monocatenario y se añaden restos de G al extremo 3' usando la enzima polinucleótido terminal transferasa. El ADNc monocatenario con cola de G se purifica después y se usa como molde para la síntesis de segunda cadena (catalizada por la enzima ADN polimerasa) usando el oligonucleótido siguiente como cebador:

50 5' - GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG CCC

CCC CCC CCC - 3' (SEC ID N°: 50)

55 El ADNc bicatenario se aísla y se usa para determinar la secuencia de nucleótidos del extremo 5' de los ARNm que codifican las cadenas pesada y ligera de la molécula de inmunoglobulina expresada. Después, se aíslan los clones genómicos de estos genes expresados. El procedimiento para clonar el gen de cadena ligera expresado se resume en la parte B a continuación.

60 B. Cadena Ligera

El ADNc bicatenario descrito en la parte A se desnaturaliza y se usa como molde para una tercera ronda de síntesis de ADN usando el cebador oligonucleotídico siguiente:

65 5' - GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG TCA TCA GAT

GGC GGG AAG ATG AAG ACA GAT GGT GCA - 3' (SEC ID N°: 51)

ES 2 345 580 T3

Este cebador contiene secuencias específicas para la porción constante del mensaje de cadena ligera κ (TCA TCA GAT GGC GGG AAG ATG AAG ACA GAT GGT GCA; SEC ID N°: 52), así como secuencias únicas que pueden usarse como cebador para la amplificación por PCR de la cadena de ADN recién sintetizada (GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG; SEC ID N°: 53). La secuencia se amplifica por PCR usando los dos cebadores oligonucleotídicos siguientes:

5'- GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG -3' (SEC ID N°: 54)

5'- GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG -3' (SEC ID N°: 53)

La secuencia amplificada por PCR se purifica después por electroforesis en gel y se usa como molde para reacciones de secuenciación dideoxi usando el oligonucleótido siguiente como cebador:

5'- GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG -3' (SEC ID N°: 54)

Los primeros 42 nucleótidos de la secuencia se usarán después para sintetizar una única sonda para aislar el gen a partir del que se transcribió el mensaje de inmunoglobulina. Este segmento de ADN de 42 nucleótidos sintético se denominará a continuación o-kappa.

Una transferencia de Southern de ADN, aislado a partir de la línea celular de expresión de Ig y digerido individualmente y en combinaciones por parejas con varias endonucleasas de restricción diferentes incluyendo SmaI, se sonda después con el oligonucleótido único o-kappa marcado con 32-P. Se identifica un sitio de endonucleasa de restricción único cadena arriba del segmento V reorganizado.

El ADN de la línea celular de expresión de Ig se corta después con SmaI y una segunda enzima (o BamHI o KpnI si existe un sitio SmaI en el interior del segmento v). Cualquier extremo no roto resultante se trata con la enzima ADN polimerasa de T4 para dar moléculas de ADN de extremos romos. Después, se añaden enlazadores codificantes de sitios de restricción (BamHI, EcoRI o XhoI dependiendo de qué sitio no exista en el fragmento) y se cortan con la enzima del enlazador correspondiente para dar fragmentos de ADN con extremos BamHI, EcoRI o XhoI. Después, el ADN se fracciona por tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa y la fracción que incluye fragmento de ADN que abarca el segmento V expresado se clona en lambda EMBL3 o Lambda FIX (Stratagene, La Jolla, California). Los clones que contienen segmento V se aíslan usando la sonda única o-kappa. Se aísla el ADN de los clones positivos y se subclona en el polienlazador de pKap1. El clon resultante se denomina pRKL.

Ejemplo 7

Aislamiento de Clones Genómicos Correspondientes a Copias Expresadas Reorganizadas de Genes μ de Cadena Pesada de Inmunoglobulina

Este ejemplo describe la clonación de genes μ de cadena pesada de inmunoglobulina a partir de células cultivadas de inmunoglobulina de interés expresada. El procedimiento descrito en este ejemplo permite la clonación selectiva de la copia expresada de un gen de cadena pesada μ .

Se prepara ADNc bicatenario y se aísla como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. El ADNc bicatenario se desnaturaliza y se usa como molde para una tercera ronda de síntesis de ADN usando el cebador oligonucleotídico siguiente:

5'- GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG ACA GGA GAC

GAG GGG GAA AAG GGT TGG GGC GGA TGC - 3' (SEC ID N°: 55)

Este cebador contiene secuencias específicas para la porción constante del mensaje de cadena pesada μ (ACA GGA GAC GAG GGG GAA AAG GGT TGG GGC GGA TGC, SEC ID N°: 56), así como secuencias únicas que pueden usarse como cebador para la amplificación por PCR de la cadena de ADN recién sintetizada (GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG; SEC ID N°: 53). La secuencia se amplifica por PCR usando los dos cebadores oligonucleotídicos siguientes:

5'- GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG -3' (SEC ID N°: 54)

5'- GTA CTC CAT ATC AGC TGG ATG AAG-3'(SEC ID N°: 57)

ES 2 345 580 T3

La secuencia amplificada por PCR se purifica después mediante electroforesis en gel y se usa como molde para reacciones de secuenciación didesoxi usando el oligonucleótido siguiente como cebador:

5 5'- GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG -3' (SEC ID N°: 54)

10 Los primeros 42 nucleótidos de secuencia se usan después para sintetizar una sonda única para aislar el gen a partir del cual se transcribió el mensaje de inmunoglobulina. Este segmento de ADN de 42 nucleótidos sintético se denominará a continuación o-mu.

15 Una transferencia de Southern de ADN, aislado a partir de la línea celular de expresión de Ig y digerido individualmente y en combinaciones por parejas con varias endonucleasas de restricción diferentes incluyendo MluI (MluI es una enzima de corte poco frecuente que escinde entre el segmento J y CH1 mu), se sonda después con el oligonucleótido único o-mu marcado con 32-P. Se identifica un sitio de endonucleasa de restricción único cadena arriba del segmento V reorganizado.

20 El ADN de la línea celular de expresión de Ig se corta después con MluI y una segunda enzima. Después, se ligan enlazadores adaptadores MluI o SpeI en los extremos y se cortan para convertir el sitio cadena arriba en MluI o SpeI. Después, el ADN se fracciona por tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa y la fracción que incluye el fragmento de ADN que abarca el segmento V expresado se clona directamente en el plásmido pGPI. Se aíslan clones que contienen segmento V usando la sonda única o-mu y el inserto se subclona en el plásmido pCON2 cortado con MluI o MluI/SpeI. El plásmido resultante se denomina pRMGH.

25 Ejemplo 8

Construcción de Transgenes de Miniloci κ Humanos

30 *Minilocus de Cadena Ligera*

35 Se exploró una biblioteca de fago de ADN genómico humano con sondas oligonucleotídicas específicas de cadena ligera kappa y se aislaron los clones que abarcaban la región J_{κ} -C. Un fragmento ClaI/XhoI de 5,7 kb que contenía $J_{\kappa}1$ junto con un fragmento XhoI de 13 kb que contenía $J_{\kappa}2-5$ y C_{κ} en pGP1d se clonó y se usó para generar el plásmido pKcor. Este plásmido contiene $J_{\kappa}1-5$, el potenciador intrónico kappa y C_{κ} junto con 4,5 kb de secuencias flanqueantes 5' y 9 kb de secuencias flanqueantes 3'. También tiene un sitio XhoI 5' único para clonar segmentos V_{κ} y un sitio Sall 3' único para insertar secuencias reguladoras que actúan en cis adicionales.

Genes kappa V

40 Se exploró una biblioteca de fago de ADN genómico humano con sondas oligonucleotídicas específicas de cadena ligera V_{κ} y se aislaron los clones que contenían segmentos V_{κ} humanos. Se identificaron segmentos V funcionales por análisis de la secuencia de ADN. Estos clones contienen cajas TATA, fases de lectura abierta que codifican péptidos líder y variable (incluyendo 2 restos de cisteína), secuencias de corte y empalme y secuencias de recombinación de heptámero-espaciador de 12 pb-nonámero. Tres de los clones se mapearon y se secuenciaron. Dos de los clones, el 65.5 y el 65.8, parecen ser funcionales, contienen cajas TATA, fases de lectura abierta que codifican péptidos líder y variable (incluyendo 2 restos de cisteína), secuencias de corte y empalme y secuencias de recombinación de heptámero-espaciador de 12 pb-nonámero. El tercer clon, 65.4, parece codificar un pseudogén de $V_{\kappa}I$ ya que contiene un heptámero de recombinación no canónico.

50 Uno de los clones funcionales, $V_{\kappa} 65-8$, que codifica un gen de la familia $V_{\kappa}III$, se usó para construir una construcción de minilocus de cadena ligera.

pKCI

55 El transgén de minilocus de cadena ligera kappa pKCI (Fig. 32) se generó por inserción de un fragmento XhoI/Sall de 7,5 kb que contenía $V_{\kappa} 65.8$ en el sitio XhoI 5' de pKcor. El inserto del transgén se aisló por digestión con NotI antes de la inyección.

60 El inserto purificado se microinyectó en los pronúcleos de embriones de ratón (C57BL/6 x CBA)F2 fertilizados y se transfirieron los embriones supervivientes a hembras pseudogestantes como se describe por Hogan *et al.* (en *Methods of Manipulating the Mouse Embryo*, 1986, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Los ratones que se desarrollaron a partir de embriones inyectados se analizaron para determinar la presencia de las secuencias transgénicas por análisis de transferencia de Southern de ADN de la cola. El número de copias del transgén se estimó por la intensidad de la banda respecto a patrones de control que contenían cantidades conocidas de ADN clonado. Se aisló suero de estos animales y se ensayó para determinar la presencia de proteína IgG kappa humana codificada por transgén mediante ELISA, como se describe por Harlow y Lane (en *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Se recubrieron pocillos de placa de microtitulación con anticuerpos monoclonales

ES 2 345 580 T3

de ratón específicos para Ig kappa humana (clon 6E1, N° 0173, AMAC, Inc., Westbrook, ME), IgM humana (Clon AF6, N° 0285, AMAC, Inc., Westbrook, ME) e IgG1 humana (clon JL512, N° 0280, AMAC, Inc., Westbrook, ME). Se realizaron diluciones seriadas de las muestras de suero en los pocillos y se detectó la presencia de inmunoglobulinas específicas con anticuerpo de cabra anti-Ig humana (polivalente) conjugado con fosfatasa alcalina aislado por afinidad que se había preadsorbido para minimizar la reactividad cruzada con inmunoglobulinas de ratón.

La Figura 35 muestra los resultados de un ensayo ELISA de suero de 8 ratones (ID N° 676, 674, 673, 670, 666, 665, 664 y 496). Los primeros siete de estos ratones se desarrollaron a partir de embriones que se inyectaron con el inserto transgénico pKC1 y el octavo ratón procede de un ratón generado por microinyección del transgén pHCl (descrito anteriormente). Dos de los siete ratones de los embriones inyectados con KC1 (ID N° 666 y 664) no contenían el inserto transgénico según se ensayó por análisis de transferencia de Southern de ADN, y cinco de los ratones (ID N° 676, 674, 673, 670 y 665) contenían el transgén. Todos salvo uno de los animales positivos para el transgén KC1 expresan niveles detectables de proteína Ig kappa humana, y el único animal que no expresa parece ser un mosaico genético basándose en el análisis de transferencia de Southern de ADN. El ratón transgénico positivo para pHCl expresa IgM e IgG1 humana pero no Ig kappa, demostrando la especificidad de los reactivos usados en el ensayo.

pKC2

El transgén de minilocus de cadena ligera kappa pKC2 se generó por inserción de un fragmento XhoI/SalI de 8 kb que contenían V_{κ} 65.5 en el sitio XhoI 5' de pKC1. El inserto transgénico resultante, que contiene dos segmentos V_{κ} , se aisló antes de la microinyección por digestión con NotI.

pKVe2

Esta construcción es idéntica a pKC1 excepto por que incluye 1,2 kb de secuencia adicional 5' de J_{κ} y carece de 4,5 kb de la secuencia 3' de V_{κ} 65.8. Además contiene un fragmento XbaI de 0,9 kb que contiene el potenciador intrónico J- μ de cadena pesada de ratón (Banerji *et al.* Cell 33: 729-740 (1983)) junto con un fragmento MluI/HindIII de 1,4 kb que contiene el potenciador intrónico J- μ de cadena pesada humana (Hayday *et al.*, Nature 307:334-340 (1984)) insertado cadena abajo. Esta construcción ensaya la viabilidad de iniciar una reorganización temprana del minilocus de cadena ligera para efectuar la exclusión alélica e isotípica. Pueden generarse construcciones análogas con potenciadores diferentes, es decir, el potenciador de cadena pesada o kappa 3' de rata o ratón (Meyer y Neuberger, EMBO J. 8:1959-1964 (1989); Petterson *et al.* Nature 344: 165-168 (1990), que se incorpora en la presente memoria como referencia).

Transgén de Cadena Ligera Reorganizado

Se diseñó un casete de expresión de cadena ligera kappa para reconstruir genes de cadena ligera funcionalmente reorganizados que se habían amplificado por PCR a partir de ADN de células B humanas. El esquema se resume en la Figura 33. Los genes de cadena ligera amplificados por PCR se clonan en el vector pK5nx que incluye 3,7 kb de secuencias flanqueantes 5' aisladas del gen de cadena ligera kappa 65.5. El segmento VJ fusionado con las secuencias transcripcionales 5' se clona después en el sitio XhoI único del vector pK31s, que incluye J_{κ} 2-4, el potenciador intrónico J_{κ} , C_{κ} y 9 kb de secuencias cadena abajo. El plásmido resultante contiene un transgén de cadena ligera kappa funcionalmente reorganizado reconstruido que puede escindirse con NotI para su microinyección en embriones. Los plásmidos también contienen sitios SalI únicos en el extremo 3' para la inserción de secuencias reguladoras que actúan en cis adicionales.

Se usaron dos oligonucleótidos sintéticos (o-130, o-131) para amplificar genes de cadena ligera kappa reorganizados a partir de ADN genómico de bazo humano. El oligonucleótido o-131 (gga ccc aga (g,c)gg aac cat gga a (g,a)(g,a,t,c)) es complementario a la región 5' de los genes de cadena ligera de la familia V_{κ} III y solapa con el primer ATC de la secuencia líder. El oligonucleótido o-130 (gtg caa tca att ctc gag ttg gac tac aga c) es complementario a una secuencia de aproximadamente 150 pb 3' de J_{κ} 1 e incluye un sitio XhoI. Estos dos oligonucleótidos amplifican un fragmento de ADN de 0,7 kb a partir de ADN de bazo humano correspondiente a genes V_{κ} III reorganizados unidos a segmentos J_{κ} 1. El ADN amplificado por PCR se digirió con NcoI y XhoI y los productos de PCR individuales se clonaron en el plásmido pNN03. Se determinó la secuencia de ADN de 5 clones y se identificaron dos uniones VJ funcionales (fases de lectura abierta). Se recogen clones de cadena ligera funcionalmente reorganizada adicionales. Los clones funcionalmente reorganizados pueden clonarse individualmente en un casete de expresión de cadena ligera descrito anteriormente (Fig. 33). Los ratones transgénicos generados con las construcciones de cadena ligera reorganizada pueden cruzarse con transgénicos de minilocus de cadena pesada para producir una cepa de ratones que expresen un espectro de anticuerpos totalmente humanos en el que la cadena pesada contribuye a toda la diversidad del repertorio primario. Una fuente de diversidad de cadena ligera puede ser a partir de mutación somática. Debido a que no todas las cadenas ligeras serán equivalentes con respecto a su capacidad para combinarse con una diversidad de cadenas pesadas diferentes, pueden generarse y ensayarse diferentes cepas de ratones, conteniendo cada una construcciones de cadena ligera diferentes. La ventaja de este esquema, al contrario que el uso de miniloci de cadena ligera no reorganizados, es el aumento de la exclusión isotípica y alélica de cadena ligera que proviene de tener la cadena ligera lista para emparejarse con una cadena pesada tan pronto como se produzca una unión VDJ de cadena pesada. Esta combinación puede dar como resultado una frecuencia aumentada de células B que expresan anticuerpos totalmente humanos y por lo tanto puede facilitar el aislamiento de hibridomas de expresión de Ig humana.

ES 2 345 580 T3

Se aislaron insertos NotI de los plásmidos pIGM1, pHC1, pIGG1, pKC1 y pKC2 de las secuencias de vector por electroforesis en gel de agarosa. Los insertos purificados se microinyectaron en los pronúcleos de embriones de ratón (C57BL/6 x CBA)F2 fertilizados y se transfirieron los embriones supervivientes a hembras pseudogestantes como se describe por Hogan *et al.* (Hogan *et al.*, Methods of Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1986)).

Ejemplo 9

10 *Inactivación del Gen de Cadena Ligera Kappa de Ratón por Recombinación Homóloga*

Este ejemplo describe la inactivación del locus kappa endógeno de ratón por recombinación homóloga en células madre embrionarias (ES) seguida de la introducción del gen mutado en la línea germinal de ratón por inyección de células ES con mutación dirigida que llevan un alelo kappa inactivado en embriones de ratón tempranos (blastocistos).

La estrategia consiste en delecionar J_K y C_K por recombinación homóloga con un vector que contiene secuencias de ADN homólogas al locus kappa de ratón en el que un segmento de 4,5 kb del locus, que abarca el gen J_K y segmentos C_K , se deleciona y sustituye por el marcador de selección neo.

20 *Construcción del vector de dirección kappa*

El plásmido pGEM7 (KJ1) contiene el gen de resistencia a neomicina (neo), usado para selección farmacológica de células ES transfectadas, bajo el control transcripcional del promotor de la fosfoglicerato quinasa (pgk) de ratón (fragmento XbaI/TaqI; Adra *et al.* (1987) Gene 60: 65) en el vector de clonación pGEM-7Zf (+). El plásmido también incluye un sitio de poliadenilación heterólogo para el gen neo derivado de la región 3' del gen pgk de ratón (fragmento PvuII/HindIII; Boer *et al.*, Biochemical Genetics, 28: 299-308 (1990)). Este plásmido se usó como punto de partida para la construcción del vector de dirección kappa. La primera etapa era insertar secuencias homólogas al locus kappa 3' del casete de expresión neo.

Se aislaron secuencias de cadena kappa de ratón (Fig. 20a) a partir de una biblioteca de fago genómica obtenida a partir de ADN de hígado usando sondas oligonucleotídicas específicas para el locus C_K :

5'- GGC TGA TGC TGC ACC AAC TGT ATC CAT CTT CCC ACC ATC CAG -3'

35 (SEC ID Nº: 58) A

y para el segmento génico J_K5 :

5'- CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGT AAG -

40 3' (SEC ID Nº: 59)

Un fragmento de BglII/SacI de 8 kb que se prolongaba 3' del segmento C_K de ratón se aisló a partir de un clon de fago positivo en dos fragmentos, como un fragmento BglII/SacI de 1,2 kb y un fragmento SacI de 6,8 kb, y se subclonó en pGEM7 digerido con BglII/SacI (KJ1) para generar el plásmido pNEO-K3' (Fig. 20b).

Un fragmento EcoRI/SphI de 1,2 kb que se prolongaba 5' de la región J_K se aisló también a partir de un clon de fago positivo. Se ligó un adaptador SphI/XbaI/BglII/EcoRI al sitio SphI de este fragmento y el fragmento EcoRI resultante se ligó en pNEO-K3' digerido con EcoRI en la misma orientación 5' a 3' que el gen neo y las secuencias kappa 3' cadena abajo para generar pNEO-K5'3' (Fig. 20c).

Después, se incluyó el gen de la timidina quinasa (TK) de Virus Herpes Simple (HSV) en la construcción para permitir el enriquecimiento de clones ES que llevan recombinantes homólogos, como se describe por Mansour *et al.*, Nature 336: 348-352 (1988), que se incorpora en la presente memoria como referencia. El casete de TK de HSV se obtuvo del plásmido pGEM7 (TK), que contiene las secuencias estructurales para el gen TK de HSV delimitadas por las secuencias de poliadenilación y de promotor pgk de ratón, como se ha descrito anteriormente para pGEM7 (KJ1). El sitio EcoRI de pGEM7 (TK) se modificó a un sitio BamHI y el casete de TK se escindió después como un fragmento BamHI/HindIII y se subclonó en pGP1b para generar pGP1b-TK. Este plásmido se linealizó en el sitio XhoI y el fragmento XhoI de pNEO-K5'3', que contenía el gen neo flanqueado por secuencias genómicas de 5' de J_K y 3' de C_K , se insertó en pGP1b-TK para generar el vector de dirección J/C KI (Fig. 20d). La supuesta estructura del locus kappa genómico después de la recombinación homóloga con J/C KI se muestra en la Fig. 20e.

Generación y análisis de células ES con inactivación dirigida de un alelo kappa

65 Las células ES usadas eran la línea AB-1 cultivada sobre capas alimentadoras de células SNL76/7 mitóticamente inactivas (McMahon y Bradley, Cell 62: 1073-1085 (1990)) esencialmente, como se describe (Robertson, E. J. (1987) en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. E. J. Robertson, ed. (Oxford: IRL Press), pág. 71-112). Otras líneas ES adecuadas incluyen, pero sin limitación, la línea E14 (Hooper *et al.* (1987) Nature 326: 292-

ES 2 345 580 T3

295), la línea D3 (Doetschman *et al.* (1985) J. Embryol. Exp. Morph. 87: 27-45) y la línea CCE (Robertson *et al.* (1986) Nature 323: 445-448). El éxito de la generación de una línea de ratón a partir de células ES que llevan una mutación dirigida específica depende de la pluripotencia de las células ES (es decir, su capacidad, una vez inyectadas en un blastocisto hospedador, para participar en la embriogénesis y contribuir a las células germinales del animal resultante).

La pluripotencia de cualquier línea celular ES dada puede variar con el tiempo en cultivo y el cuidado con el que se haya manipulado. El único ensayo definitivo para la pluripotencia es determinar si la población específica de células ES a usar para la mutación dirigida puede dar origen a quimeras capaces de transmisión de línea germinal del genoma de ES. Por esta razón, antes de la mutación dirigida de genes, una porción de la población parental de células AB-1 se inyecta en blastocistos C57B1/6J para determinar si las células son capaces de generar ratones quiméricos con una amplia contribución de células ES y si la mayoría de estas quimeras pueden transmitir el genoma ES a la progenie.

El vector de inactivación de cadena kappa J/C K1 se digirió con NotI y se insertó por electroporación en células AB-1 mediante los métodos descritos (Hasty *et al.*, Nature, 350: 243-246 (1991)). Las células sometidas a electroporación se sembraron en placas de 100 mm a una densidad de $1-2 \times 10^6$ células/placa. Después de 24 horas, se añadió G418 (200 $\mu\text{g/ml}$ de componente activo) y FIAU (0,5 μM) al medio y se dejó que los clones resistentes a fármacos se desarrollaran durante 10-11 días. Se escogieron los clones, se trataron con tripsina, se dividieron en dos porciones y se expandieron adicionalmente. La mitad de las células derivadas de cada clon se congelaron después y la otra mitad se analizó para determinar la recombinación homóloga entre secuencias de vector y diana.

El análisis de ADN se realizó por hibridación de transferencia de Southern. El ADN se aisló a partir de los clones como se describe (Laird *et al.*, Nucl. Acids Res. 19: 4293 (1991)), se digirió con XbaI y se sondó con el fragmento EcoRI/XbaI de 800 pb indicado en la Figura 20e como sonda A. Esta sonda detecta un fragmento XbaI de 3,7 kb en el locus de tipo silvestre y una banda de 1,8 kb de diagnóstico en un locus que se ha recombinado de forma homóloga con el vector de dirección (véase las Fig. 20a y e). De los 901 clones resistentes a G418 y FIAU explorados por análisis de transferencia de Southern, 7 presentaban la banda XbaI de 1,8 kb indicativa de una recombinación homóloga en uno de los genes kappa. Estos 7 clones se digirieron adicionalmente con las enzimas BglII, SacI y PstI para verificar que el vector se integraba de forma homóloga en uno de los genes kappa. Cuando se sondan con el fragmento EcoRI/XbaI de 800 pb de diagnóstico (sonda A), las digestiones con BglII, SacI y PstI de ADN de tipo silvestre producen fragmentos de 4,1, 5,4 y 7 kb, respectivamente, mientras que la presencia de un alelo kappa con mutación dirigida se indicaría por fragmentos de 2,4, 7,5 y 5,7 kb, respectivamente (véase las Fig. 20a y e). Los 7 clones positivos detectados por la digestión con XbaI mostraban los fragmentos de restricción BglII, SacI y PstI esperados, diagnósticos de una recombinación homóloga en la cadena ligera kappa. Además, el análisis de transferencia de Southern de una digestión con NsiI de los clones con mutación dirigida usando una sonda específica neo (sonda B, Figura 20e) generaba sólo el fragmento esperado de 4,2 kb, demostrando que cada uno de los clones contenía solamente una sola copia del vector de dirección.

Generación de ratones que llevan la cadena kappa inactivada

Cinco de los clones de ES con mutación dirigida descritos en la sección anterior se descongelaron y se inyectaron en blastocistos C57B1/6J como se describe (Bradley, A. (1987) en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. E. J. Robertson, ed. (Oxford: IRL Press), pág. 113-151) y se transfirieron a los úteros de hembras pseudogestantes para generar ratones quiméricos como resultado de una mezcla de células derivadas de las células ES aportadas y el blastocisto del hospedador. El grado de contribución de células ES a las quimeras puede estimarse visualmente por la cantidad de coloración de pelaje agutí, derivada de la línea celular ES, sobre el fondo C57B1/6J negro. Aproximadamente la mitad de los descendientes resultantes de la inyección de blastocisto de los clones con mutación dirigida eran quiméricos (es decir, mostraban pigmentación agutí además de negra) y de estos, la mayoría mostraban una amplia contribución de células ES (del 70 por ciento o superior) a la pigmentación del pelaje. Las células ES AB1 son una línea celular XY y la mayoría de estas quimeras de alto porcentaje eran masculinas debido a la conversión de sexo de embriones hembra colonizados por células ES masculinas. Las quimeras masculinas derivadas de 4 de los 5 clones con mutación dirigida se cruzaron con hembras C57BL/6J y la descendencia se controló para determinar la presencia del color de pelaje agutí dominante indicativo de transmisión de línea germinal del genoma de ES. Las quimeras de dos de estos clones generaban sistemáticamente descendencia agutí. Puesto que se introducía por mutación dirigida solamente una copia del locus kappa en los clones de ES inyectados, cada cría agutí tenía una probabilidad del 50 por ciento de heredar el locus mutado. La exploración del gen con mutación dirigida se realizó por análisis de transferencia de Southern de ADN digerido con BglII a partir de biopsias de la cola usando la sonda utilizada en la identificación de clones ES con mutación dirigida (sonda A, Fig. 20e). Como se espera, aproximadamente el 50 por ciento de la descendencia agutí mostraba una banda BglII de hibridación de 2,4 kb además de la banda de tipo silvestre de 4,1 kb, demostrando la transmisión de línea germinal del locus kappa con mutación dirigida.

Para generar ratones homocigotos para la mutación, se cruzaron entre sí heterocigotos y el genotipo kappa de la descendencia se determinó como se ha descrito anteriormente. Como se esperaba, se obtuvieron tres genotipos de los emparejamientos heterocigotos: ratones de tipo silvestre que llevaban dos copias de un locus kappa normal, heterocigotos que llevaban una copia con mutación dirigida del gen kappa y un gen kappa NT y ratones homocigotos para la mutación kappa. La delección de secuencias kappa de estos últimos ratones se verificó por hibridación de las transferencias de Southern con una sonda específica para J_K (sonda C, Fig. 20a). Mientras que se observó hibridación

de la sonda J_K con muestras de ADN de hermanos heterocigotos y de tipo silvestre, no estaba presente señal de hibridación en los homocigotos, atestiguando la generación de una nueva cepa de ratón en la que ambas copias del locus kappa se han inactivado por delección como resultado de una mutación dirigida.

5 Ejemplo 10

Inactivación del Gen de Cadena Pesada de Ratón por Recombinación Homóloga

10 Este ejemplo describe la inactivación del locus de cadena pesada de inmunoglobulina murina endógeno por recombinación homóloga en células madre embrionarias (ES). La estrategia consiste en deleccionar segmentos J de cadena pesada endógena por recombinación homóloga con un vector que contiene secuencias de cadena pesada de las que se ha deleccionado la región J_H y sustituido por el gen para el marcador de selección neo.

15 *Construcción de un vector de dirección de cadena pesada*

Se aislaron secuencias de cadena pesada de ratón que contenían la región J_H (Fig. 21a) a partir de una biblioteca de fago genómica derivada de la línea celular ES D3 (Gossler *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:9065-9069 (1986)) usando una sonda oligonucleotídica específica de J_H4:

20 5'- ACT ATG CTA TGG ACT ACT GGG GTC AAG GAA CCT CAG TCA CCG -3'
(SEC ID N°: 60)

25 Un fragmento SacI/StuI genómico de 3,5 kb que abarca la región J_H se aisló a partir de un clon de fago positivo y se subclonó en pUC18 digerido con SacI/SmaI. El plásmido resultante se denominó pUC18 J_H. El gen de resistencia a neomicina (neo) usado para la selección farmacológica de células ES transfectadas procedía de una versión reparada del plásmido pGEM7 (KJ1). Un informe en la bibliografía (Yenofsky *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 87: 3435-3439) documenta una mutación puntual de las secuencias codificantes de neo de varios vectores de expresión
30 usados comúnmente incluyendo la construcción de pMCIneo (Thomas y Cappechi (1987) Cell 51: 503-512) que sirvió como fuente del gen neo usado en pGEM7 (KJ1). Esta mutación reduce la actividad del producto génico neo y se reparó por sustitución de un fragmento de restricción que incluye la mutación con la secuencia correspondiente de un clon neo de tipo silvestre. El sitio HindIII en el pGEM7 preparado (KJ1) se convirtió en un sitio SalI por adición de un adaptador sintético y el casete de expresión neo se escindió por digestión con XbaI/SalI. Después, los extremos del
35 fragmento neo se hicieron romos por tratamiento con la forma Klenow de la ADN pol y el fragmento neo se subclonó en el sitio NaeI de pUC18J_H, generando el plásmido pUC18J_H-neo (Fig. 21b).

Se realizó una construcción adicional del vector de dirección en un derivado del plásmido pGP1b. El pGP1b se digirió con la enzima de restricción NotI y se ligó con el oligonucleótido siguiente como adaptador:

40 5'- GGC CGC TCG ACG ATA GCC TCG AGG CTA TAA ATC TAG AAG AAT
TCC AGC AAA GCT TTG GC -3' (SEC ID N°: 61)

45 El plásmido resultante, denominado pGMT, se usó para construir la construcción de dirección de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón.

Se incluyó el gen de timidina quinasa (TK) del Virus Herpes Simple (HSV) en la construcción para permitir el enriquecimiento de clones ES que llevan recombinantes homólogos, como se describe por Mansour *et al.* (Nature 336, 348-352 (1988)). El gen TK de HSV se obtuvo a partir del plásmido pGEM7 (TK) por digestión con EcoRI y HindIII. El fragmento de ADN de TK se subclonó entre los sitios EcoRI y HindIII de pGMT, generando el plásmido pGMT-TK (Fig. 21c).

55 Para proporcionar una amplia región de homología con la secuencia diana, un fragmento XbaI/XhoI genómico de 5,9 kb situado 5' de la región J_H se obtuvo a partir de un clon de fago genómico positivo por digestión límite del ADN con XhoI y digestión parcial con XbaI. Como se señala en la Fig. 21a, este sitio XbaI no está presente en el ADN genómico, sino que más bien procede de secuencias de fago inmediatamente flanqueando el inserto de cadena pesada genómico clonado en el clon de fago positivo. El fragmento se subclonó en pGMT-TK digerido con XbaI/XhoI para
60 generar el plásmido pGMT-TK-J_H5' (Fig. 21d).

La etapa final en la construcción implicaba la escisión de pUC18 J_H-neo del fragmento EcoRI de 2,8 kb que contenía el gen neo y secuencias genómicas flanqueantes 3' de J_H. Este fragmento se hizo romo mediante polimerasa Klenow y se subclonó en el sitio XhoI hecho romo de forma similar de pGMT-TK-J_H5'. La construcción resultante
65 J_HKO1 (Fig. 21e) contiene 6,9 kb de secuencias genómicas flanqueando el locus J_H con una delección de 2,3 kb que abarca la región J_H en la que se ha insertado el gen neo. La Fig. 21f muestra la estructura de un gen de cadena pesada endógeno después de la recombinación homóloga con la construcción de dirección.

Ejemplo 11

Generación y análisis de células ES con mutación dirigida

5 Se cultivaron células ES AB-1 (McMahon y Bradley, Cell 62: 1073-1085 (1990)) sobre capas alimentadoras de células SNL76/7 mitóticamente inactivas esencialmente como se describe (Robertson, E. J. (1987) Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. E. J. Robertson, ed. (Oxford: IRL Press), págs. 71-112). Como se ha descrito en el ejemplo anterior, antes de la electroporación de células ES con la construcción de dirección J_H KO1, se determinó la pluripotencia de las células ES por generación de quimeras derivadas de AB-1 que se demostró que
10 eran capaces de transmisión de línea germinal del genoma de ES.

El vector de inactivación de cadena pesada J_H KO1 se digirió con NotI y se introdujo por electroporación en células AB-1 mediante los métodos descritos (Hasty *et al.*, Nature 350:243-246 (1991)). Las células sometidas a electroporación se sembraron en placas de 100 mm a una densidad de $1-2 \times 10^6$ células/placa. Después de 24 horas, se añadió
15 G418 (200 mg/ml de componente activo) y FIAU (0,5 mM) al medio y se dejó que los clones resistentes a fármacos se desarrollaran durante 8-10 días. Se escogieron los clones, se trataron con tripsina, se dividieron en dos porciones y se expandieron adicionalmente. La mitad de las células derivadas de cada clon se congelaron después y la otra mitad se analizó para determinar la recombinación homóloga entre secuencias de vector y diana.

20 El análisis de ADN se realizó mediante hibridación de transferencia de Southern. El ADN se aisló a partir de los clones como se describe (Laird *et al.* (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4293), se digirió con StuI y se sondó con el fragmento EcoRI/StuI de 500 pb denominado sonda A en la Fig. 21f. Esta sonda detecta un fragmento StuI de 4,7 kb en el locus de tipo silvestre, mientras que una banda de 3 kb es diagnóstica de recombinación homóloga de secuencias endógenas con el vector de dirección (véanse las Fig. 21a y f). De los 525 clones doblemente resistentes a G418 y FIAU explorados por hibridación de transferencia de Southern, se descubrió que 12 contenían el fragmento
25 de 3 kb diagnóstico de la recombinación con el vector de dirección. Se confirmó que estos clones representan los acontecimientos dirigidos esperados en el locus J_H (como se muestra en la Fig. 21f) mediante una digestión adicional con HindIII, SpeI y HpaI. La hibridación de la sonda A (véase la Fig. 21f) con transferencias de Southern de ADN digerido con HindIII, SpeI y HpaI produce bandas de ADN de 2,3 kb, >10 kb y >10 kb, respectivamente, para el locus de tipo silvestre (véase la Fig. 21a), mientras que se esperan bandas de 5,3 kb, 3,8 kb y 1,9 kb, respectivamente,
30 para el locus de cadena pesada con mutación dirigida (véase la Fig. 21f). Los 12 clones positivos detectados mediante la digestión con StuI mostraban las bandas HindIII, SpeI y HpaI esperadas diagnósticas de un gen J_H con mutación dirigida. Además, el análisis de transferencia de Southern de una digestión con StuI de los 12 clones usando una sonda específica de neo (sonda B, Figura 21f) generaba sólo el fragmento esperado de 3 kb, demostrando que cada uno de
35 los clones contenía solamente una sola copia del vector de dirección.

Generación de ratones que llevan la delección J_H

Tres de los clones ES con mutación dirigida descritos en la sección anterior se descongelaron y se inyectaron
40 en blastocistos C57BL/6J como se describe (Bradley, A. (1987) en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (Oxford: IRL Press), pág. 113-151) y se transfirieron a los úteros de hembras pseudogestantes. El grado de contribución de células ES a la quimera se estimó visualmente a partir de la cantidad de coloración de pelaje agutí, derivada de la línea celular ES, sobre el fondo C57BL/6J negro. La mitad de los descendientes resultantes de la inyección de blastocisto de dos de los clones con mutación dirigida eran quiméricos (es
45 decir, mostraban pigmentación agutí además de negra); el tercer clon con mutación dirigida no generaba ningún animal quimérico. La mayoría de las quimeras mostraban una contribución de células ES significativa (aproximadamente del 50 por ciento o superior) a la pigmentación del pelaje. Puesto que las células ES AB-1 son una línea celular XY, la mayoría de las quimeras serán masculinas debido a la conversión de sexo de embriones hembra colonizados por células ES masculinas. Las quimeras masculinas se cruzaron con hembras C57BL/6J y la descendencia se controló
50 para determinar la presencia de color de pelaje agutí dominante indicativo de transmisión de línea germinal del genoma de ES. Las quimeras de ambos clones generaban sistemáticamente descendencia agutí. Puesto que se introducía por mutación dirigida solamente una copia del locus de cadena pesada en los clones de ES inyectados, cada cría agutí tenía una probabilidad del 50 por ciento de heredar el locus mutado. La exploración del gen con mutación dirigida se realizó por análisis de transferencia de Southern de ADN digerido con StuI a partir de biopsias de la cola usando la
55 sonda utilizada en la identificación de clones ES con mutación dirigida (sonda A, Fig. 21f). Como se espera, aproximadamente el 50 por ciento de la descendencia agutí mostraba una banda StuI de hibridación de aproximadamente 3 kb además de la banda de tipo silvestre de 4,7 kb, demostrando la transmisión de línea germinal del segmento génico J_H con mutación dirigida.

60 Para generar ratones homocigotos para la mutación, se cruzaron heterocigotos entre sí y el genotipo de cadena pesada de la descendencia se determinó como se ha descrito anteriormente. Como se esperaba, se obtuvieron tres genotipos a partir de los emparejamientos heterocigotos: ratones de tipo silvestre que llevaban dos copias del locus J_H normal, heterocigotos que llevaban una copia con mutación dirigida del gen y una copia normal y ratones homocigotos para la mutación J_H . La ausencia de secuencias J_H a partir de estos últimos ratones se verificó por hibridación de las transferencias
65 de Southern de ADN digerido con StuI con una sonda específica para J_H (sonda C, Fig. 21a). Mientras que se observó hibridación de la sonda de J_H con un fragmento de 4,7 kb en muestras de ADN de hermanos heterocigotos y de tipo silvestre, no estaba presente señal en muestras de los homocigotos mutantes de J_H , atestiguando la generación de una nueva cepa de ratón en la que ambas copias del gen de cadena pesada se han mutado por delección de las secuencias J_H .

ES 2 345 580 T3

Ejemplo 12

Transgén de Minilocus de Cadena Pesada

5 A. Construcción de vectores plasmídicos para clonar secuencias de ADN de gran tamaño

1. pGP1a

El plásmido pBR322 se digirió con EcoRI y StyI y se ligó con los oligonucleótidos siguientes:

oligo-42

5'- caa gag ccc gcc taa tga gcg ggc ttt ttt ttg cat

act gcg gcc gct -3' (SEC ID N°: 62)

oligo-43

5'- aat tag cgg ccg cag tat gca aaa aaa agc ccg ctc

att agg cgg gct -3' (SEC ID N°: 63)

El plásmido resultante, pGP1a, está diseñado para clonar construcciones de ADN muy grandes que pueden escindirse mediante la enzima de restricción de corte poco frecuente NotI. Contiene un sitio de restricción NotI cadena abajo (respecto al gen de resistencia a ampicilina, AmpR) de una señal de terminación de la transcripción potente derivada del gen *trpA* (Christie *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:4180 (1981)). Esta señal de terminación reduce la toxicidad potencial de las secuencias codificantes insertadas en el sitio NotI eliminando la transcripción por translectura del gen AmpR. Además, este plásmido es de bajo número de copias respecto a los plásmidos pUC porque conserva la región de control del número de copias de pBR322. El bajo número de copias reduce adicionalmente la toxicidad potencial de las secuencias de insertos y reduce la selección contra insertos de gran tamaño debido a replicación del ADN. Los vectores pGP1b, pGP1c, pGP1d, y pGP1f proceden de pGP1a y contienen diferentes sitios de clonación de polienlazador. Las secuencias de polienlazador se proporcionan a continuación

pGP1a

NotI
GCGGCCGC

pGP1b

NotI XhoI ClaI BamHI HindIII NotI
GCggccgcctcgagatcactatcgattaattaaggatccagcagtaagcttgcGGCCGC (SEC ID N°: 64)

pGP1c

NotI SmaI XhoI SalI HindIII BamHI SacII NotI
GCggccgcatecccggtctcgaggtcgacaagctttcgaggatccgcGGCCGC (SEC ID N°: 65)

pGP1d

NotI SalI HindIII ClaI BamHI XhoI NotI
GCggccgctgtcgacaagcttctcgatggatcctcgagtgcGGCCGC (SEC ID N°: 66)

pGP1f

NotI SalI HindIII EcoRI ClaI Kpr.I BamHI XhoI NotI
GCggccgctgtcgacaagcttctgaattcagatcgatgtggtacctggatcctcgagtgcGGCCGC (SEC ID N°: 67)

ES 2 345 580 T3

Cada uno de estos plásmidos puede usarse para la construcción de insertos de transgén de gran tamaño que pueden escindirse con NotI de modo que el ADN transgénico pueda purificarse de las secuencias de vector antes de la microinyección.

5

2. *pGP1b*

Se digirió pGP1a con NotI y se ligó con los oligonucleótidos siguientes:

10

oligo-47

5'- ggc cgc aag ctt act gct gga tcc tta att aat cga

15

tag tga tct cga ggc -3' (SEC ID N°: 68)

oligo-48

5'- ggc cgc ctc gag atc act atc gat taa tta agg atc

20

cag cag taa gct tgc -3' (SEC ID N°: 69)

25

El plásmido resultante, pGP1b, contiene una región polienlazadora corta flanqueada por sitios NotI. Esto facilita la construcción de insertos de gran tamaño que pueden escindirse por digestión con NotI.

3. *pGPe*

30

Los oligonucleótidos siguientes:

35

oligo-44

5'- ctc cag gat cca gat atc agt acc tga aac agg gct

tgc -3' (SEC ID N°: 70)

40

oligo-45

5'- ctc gag cat gca cag gac ctg gag cac aca cag cct

tcc -3' (SEC ID N°: 71)

45

se usaron para amplificar el potenciador 3' de cadena pesada de inmunoglobulina (S. Petterson, *et al.*, Nature 344: 165-168 (1990)) a partir de ADN de hígado de rata mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

50

El producto amplificado se digirió con BamHI y SphI y se clonó en pNN03 digerido con BamHI/SphI (pNN03 es un plásmido derivado de pUC que contiene un polienlazador con los sitios de restricción siguientes, enumerados en orden: NotI, BamHI, NcoI, ClaI, EcoRV, XbaI, SacI, XhoI, SphI, PstI, BglIII, EcoRI, SmaI, KpnI, HindIII y NotI). El plásmido resultante, pRE3, se digirió con BamHI y HindIII y el inserto que contiene el potenciador 3' de cadena pesada de Ig de rata se clonó en pGP1b digerido con BamHI/HindIII. El plásmido resultante, pGPe (Fig. 22 y Tabla 1) contiene varios sitios de restricción únicos en los que pueden clonarse secuencias y posteriormente escindirse junto con el potenciador 3' por digestión con NotI.

60

65

ES 2 345 580 T3

B. Construcción de transgén de minilocus de expresión de IgM, pIGM1

1. Aislamiento de clones de región constante J- μ y construcción de pJM1

5 Se exploró una biblioteca de ADN genómico placentario humano clonada en el vector de fago λ EMBL3/SP6/T7 (Clonotech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) con el oligonucleótido específico de región J de cadena pesada humana:

oligo-1

10 5'- gga ctg tgt ccc tgt gtg atg ctt ttg atg tct ggg
gcc aag -3' (SEC ID N°:73)

15 y se aisló el clon de fago λ 1.3. Se aisló un fragmento HindIII/KpnI de 6 kb a partir de este clon, que contenía los seis segmentos J, así como el segmento D de DHQ52 y el potenciador intrónico J- μ de cadena pesada. Se exploró la misma biblioteca con el oligonucleótido específico de μ humano:

oligo-2

20 5'- cac caa gtt gac ctg cct ggt cac aga cct gac cac
cta tga -3' (SEC ID N°: 74)

25 y se aisló el clon de fago λ 2.1. Se aisló un fragmento HindIII/XhoI de 10,5 kb que contenía la región de cambio μ y todas las exones de región constante μ a partir de este clon. Estos dos fragmentos se ligaron entre sí con pNNO3 digerido con KpnI/XhoI para obtener el plásmido pJM1.

2. pJM2

30 Se aisló un fragmento XhoI de 4 kb a partir del clon de fago λ 2.1 que contiene secuencias inmediatamente cadena abajo de las secuencias en pJM1, incluyendo el denominado elemento $\Sigma\mu$ implicado en la delección asociada a δ de la μ en determinadas células B de expresión de IgD (Yasui *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 19: 1399 (1989), que se incorpora en la presente memoria como referencia). Este fragmento se trató con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y se ligó con pJM1 tratado con Klenow cortado con XhoI. El plásmido resultante, pJM2 (Fig. 23) había perdido el sitio XhoI interno pero conservaba el sitio XhoI 3' debido a una reacción incompleta por la enzima Klenow. El pJM2 contiene la región J humana completa, el potenciador intrónico J- μ de cadena pesada, la región de cambio μ y todos los exones de la región constante μ , así como las dos repeticiones directas de 0,4 kb, $\sigma\mu$ y $\Sigma\mu$, implicadas en la delección asociada a δ del gen de μ .

3. Aislamiento de clones de región D y construcción de pDH1

45 El oligonucleótido específico de región D humana siguiente:

oligo-4

50 5'- tgg tat tac tat ggt tgc ggg agt tat tat aac cac
agt gtc -3' (SEC ID N°:75)

55 se usa para explorar la biblioteca genómica de placenta humana para clones de región D. Se aislaron los clones de fago λ 4.1 y λ 4.3. Un fragmento XhoI de 5,5 kb que incluye los elementos D D_{K1} , D_{N1} y D_{M2} (Ichihara *et al.*, *EMBO J.* 7:4141 (1988)) se aisló del clon de fago λ 4.1. Un fragmento XhoI de 5,2 kb cadena arriba adyacente que incluye los elementos D D_{LR1} , D_{XP1} , $D_{XP1'}$ y D_{A1} se aisló del clon de fago λ 4.3. Cada uno de estos fragmentos XhoI de región D se clonó en el sitio SalI del vector plasmídico pSP72 (Promega, Madison, WI) para destruir el sitio XhoI que une las dos secuencias. El fragmento cadena arriba se escindió después con XhoI y SmaI, y el fragmento cadena abajo con EcoRV y XhoI. Los fragmentos aislados resultantes se ligaron entre sí con pSP72 digerido con SalI para dar el plásmido pDH1. El pDH1 contiene un inserto de 10,6 kb que incluye al menos 7 segmentos D y puede escindirse con XhoI (5') y EcoRV (3').

4. pCOR1

65 El plásmido pJM2 se digirió con Asp718 (un isoesquizómero de KpnI) y el extremo saliente se rellenó con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I. Después, el ADN resultante se digirió con ClaI y se aisló el inserto. Este inserto se ligó con el inserto XhoI/EcoRV de pDH1 y pGPe digerido con XhoI/ClaI para generar pCOR1 (Fig. 24).

ES 2 345 580 T3

5. *pVH251*

Un fragmento HindIII genómico de 10,3 kb que contenía los dos segmentos de región variable de cadena pesada humana V_H251 y V_H105 (Humphries *et al.*, Nature 331:446 (1988), que se incorpora en la presente memoria como referencia) se subclonó en pSP72 para dar el plásmido pVH251.

6. *pIGM1*

El plásmido pCOR1 se digirió parcialmente con XhoI y el inserto XhoI/SalI aislado de pVH251 se clonó en el sitio XhoI cadena arriba para generar el plásmido pIGM1 (Fig. 25). El pIGM1 contiene 2 segmentos de región variable humana funcional, al menos 8 segmentos D humanos, los 6 segmentos J_H humanos, el potenciador $J-\mu$ humano, el elemento $\sigma\mu$ humano, la región de cambio μ humana, todos los exones codificantes de μ humana y el elemento $\Sigma\mu$ humano junto con el potenciador 3' de cadena pesada de rata, de modo que todos estos elementos de secuencia pueden aislarse en un solo fragmento de las secuencias de vector por digestión con NotI y microinyectarse en pronúcleos de embrión de ratón para generar animales transgénicos.

C. Construcción de transgén de minilocus de expresión de IgM e IgG, *pHC1*

1. Aislamiento de clones de la región constante γ

El oligonucleótido siguiente, específico para genes de región constante de IgG humana:

oligo-29

5'- cag cag gtg cac acc caa tgc cca tga gcc cag aca

ctg gac -3' (SEC ID N°76)

se usó para explorar la biblioteca genómica humana. Se aislaron los clones de fago $\lambda29.4$ y $\lambda29.5$. Un fragmento HindIII de 4 kb del clon de fago $\lambda29.4$ que contenía una región de cambio γ se usó para sondar una biblioteca de ADN genómico de placenta humana clonada en el vector de fago lambda FIXTM II (Stratagene, La Jolla, CA). El clon de fago $\lambda Sg1.13$ se aisló. Para determinar la subclase de los diferentes clones γ , se realizaron reacciones de secuenciación dideoxi usando subclones de cada uno de los tres clones de fago como moldes y el oligonucleótido siguiente como cebador:

oligo-67 5'- tga gcc cag aca ctg gac -3' (SEC ID N°: 77)

Se determinó que ambos clones de fago $\lambda29.5$ y $\lambda S\gamma1.13$ eran de la subclase $\gamma1$.

2. *p $\gamma e1$*

Un fragmento HindIII de 7,8 kb del clon de fago $\lambda29.5$ que contenía la región codificante $\gamma1$ se clonó en pUC18. El plásmido resultante, pLT1, se digirió con XhoI, se trató con Klenow y se volvió a ligar para destruir el sitio XhoI interno. El clon resultante, pLT1xk, se digirió con HindIII y el inserto se aisló y se clonó en pSP72 para generar el clon de plásmido pLT1xks. La digestión de pLT1xks en un sitio XhoI del polienlazador y una secuencia humana derivada del sitio BamHI genera un fragmento de 7,6 kb que contiene los exones codificantes de la región constante $\gamma1$. Este fragmento XhoI/BamHI de 7,6 kb se clonó junto con un fragmento BamHI de 4,5 kb cadena abajo adyacente del clon de fago $\lambda29.5$ en pGPe digerido con XhoI/BamHI para generar el clon de plásmido *p $\gamma e1$* . El *p $\gamma e1$* contiene todos los exones codificantes de la región constante $\gamma1$ junto con 5 kb de secuencias cadena abajo, unidos al potenciador 3' de cadena pesada de rata.

3. *p $\gamma e2$*

Un fragmento HindIII de 5,3 kb que contenía la región de cambio $\gamma1$ y el primer exón del transcrito estéril pre-cambio (P. Sideras *et al.* (1989) International Immunol. 1, 631) se aislaron del clon de fago $\lambda S\gamma1.13$ y se clonaron en el pSP72 con el sitio XhoI del polienlazador adyacente al extremo 5' del inserto para generar el clon de plásmido pS $\gamma1s$. El inserto XhoI/SalI de pS $\gamma1s$ se clonó en *p $\gamma e1$* digerido con XhoI para generar el clon de plásmido *p $\gamma e2$* (Fig. 26). El *p $\gamma e2$* contiene todos los exones codificantes de la región constante $\gamma1$ y la región de cambio cadena arriba y exones de transcritos estériles, junto con 5 kb de secuencias cadena abajo, unidos al potenciador 3' de cadena pesada de rata. Este clon contiene un sitio XhoI único en el extremo 5' del inserto. El inserto completo, junto con el sitio XhoI y el potenciador de rata 3', pueden escindirarse de secuencias de vector por digestión con NotI.

4. *pHC1*

El plásmido pIGM1 se digirió con XhoI y el inserto de 43 kb se aisló y se clonó en pge2 digerido con XhoI para generar el plásmido pHC1 (Fig. 25). El pHC1 contiene 2 segmentos de región variable humana funcional, al menos 8 segmentos D humanos, los 6 segmentos J_H humanos, el potenciador J- μ humano, el elemento $\sigma\mu$, humano, la región de cambio μ humana, todos los exones codificantes de μ humana, el elemento $\Sigma\mu$ humano y la región constante $\gamma 1$ humana, incluyendo la región de cambio asociada y los exones asociados a transcritos estériles, junto con el potenciador 3' de cadena pesada de rata, de modo que todos estos elementos de secuencia pueden aislarse en un solo fragmento de las secuencias de vector, por digestión con NotI, y microinyectarse en pronúcleos de embriones de ratón para generar animales transgénicos.

D. *Construcción de transgén de minilocus de expresión de IgM e IgG, pHC2*15 1. *Aislamiento de gen de región V de cadena pesada humana VH49.8*

Se exploró la biblioteca de ADN genómico placentario humano lambda FIXTM II, (Stratagene, La Jolla, CA) con el oligonucleótido específico de la familia de VH1 humana siguiente:

20

oligo-49

25

5'- gtt aaa gag gat ttt att cac ccc tgt gtc ctc tcc
aca ggt gtc -3' (SEC ID N°: 78)

30

Se aisló el clon de fago $\lambda 49.8$ y un fragmento XbaI de 6,1 kb que contenía el segmento variable VH49.8 se subclonó en pNN03 (de modo que el sitio ClaI del polienlazador esté cadena abajo de VH49.8 y el sitio XhoI del polienlazador esté cadena arriba) para generar el plásmido pVH49.8. Se secuenció una región de 800 pb de este inserto y se descubrió que VH49.8 tiene una fase de lectura abierta y señales de recombinación y corte y empalme intactas, indicando así que el gen es funcional (Tabla 2).

35

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 345 580 T3

TABLA 2

Secuencia del gen de la familia V_HI humana V_H 49.8 (SEC ID N°: 79 y 80)

5	TTCCTCAGGC	AGGATTTAGG	GCFTGGTCTC	TCAGCATCCC	ACACTTGTAC	50
	AGCTGATGTG	GCATCTGTGT	TTTCTTTCTC	ATCCTAGATC	AAGCTTTGAG	100
10	CTGTGAAATA	CCCTGCCTCA	TGAATATGCA	AATAATCTGA	GGTCTTCTGA	150
	GATAAATATA	GATATATTGG	TGCCCTGAGA	GCATCACATA	ACAACCAGAT	200
15	TCCTCCTCTA	AAGAAAGCCCC	TGGGAGCACA	GCTCATCACC	ATCGACTCGA	250
					MetAspTrpT	
20	CCTGGAGGTT	CCTCTTTGTG	GTGGCAGCAG	CTACAGgtaa	ggggctcccc	300
	hrTrpArgPh	eLeuPheVal	ValAlaAlaA	laThr		
25	agtcctaagg	ctgaggaagg	gatsctgggt	tagttaaaga	ggattttatt	350
	caccctctgtg	tcctctccac	agGTGTCCAG	TCCCAGGTCC	AGCTGGTGCA	400
			GlyValGln	SerGlnValG	lnLeValGI	
30	GTCTGGGGCT	GAGGTGAAGA	AGCCTGGGTC	CTCGGTGAAG	GTCTCCTGCA	450
	nSerGlyAla	GluValLysL	ysProGlySe	rSerValLys	ValSerCysL	
35	AGCCTTCTGG	AGGCACCTTC	AGCAGCTATG	CTATCAGCTG	GGTGGCAGAG	500
	ysAlaSerGl	yGlyThrPhe	SerSerTyrA	laIleSerTr	pValArgGln	
40	GCCCTGGAC	AAGGGCTTGA	GTGGATGGGA	AGGATCATCC	CTATCCTTGG	550
	AlaProGlyG	lnGlyLeuGl	uTrpMetGly	argIleIleP	roIleLeuGl	
45	TATAGCADAAC	TAGGCACAGA	AGTTCACAGG	CAGAGTCACG	ATTACCGCGG	600
	YILEaLaASN	TYRaLaGLNl	YSpHEeLNqL	YaRGVALtHR	ILEtNRaLa	
50	ACAAATCCAC	GAGCACAGCC	TACATGGAGC	TGACGAGCCT	GAGGTCTGAG	650
	spLysSerTr	rSerThrAla	TyrMetGluL	euSerSerLe	wArgSerGlu	
55	GACACGGCCG	TCTATTACTG	TGGAGAGAGC	ACAGTgTGAA	AACCCACATC	700
	AspThrAlaV	altyrTyr Cy	sAlaArg			
60	CTGAGAGTGT	CAGAAACGCT	GAGGGAGAAG	GCAGCTGTGC	CGGGCTGAGG	750
65	AGATGACAGG	GTTTATTAGG	TTTAAGGCTC	TTTACAAAAT	GGTTATATA	800
70	TTTGAGAAA	AA				812

2. pV2

Un fragmento genómico XbaI de 4 kb que contiene el gen de la familia V_HIV humana V_H4-21 (Sanz *et al.*, EMBO J., 8: 3741 (1989)), subclonado en el plásmido pUC12, se escindió con SmaI y HindIII y se trató con el fragmento Klenow de polimerasa I. El fragmento de extremos romos se clonó después en pVH49.8 tratado con Klenow digerido con ClaI. El plásmido resultante, pV2, contiene el gen de cadena pesada humana VH49.8 unido cadena arriba de VH4-21 en la misma orientación, con un sitio SalI único en el extremo 3' del inserto y un sitio XhoI único en el extremo 5'.

3. pSyl-5'

Un fragmento XbaI/HindIII de 0,7 kb (que representa secuencias inmediatamente cadena arriba de, y adyacentes al fragmento que contiene la región de cambio γ 1 de 5,3 kb en el plásmido p γ e2), junto con el fragmento XbaI de 3,1 kb cadena arriba vecino, se aislaron del clon de fago λ Sg1.13 y se clonaron en vector pUC18 digerido con HindIII/XbaI.

ES 2 345 580 T3

El plásmido resultante, pS γ 1-5', contiene un inserto de 3,8 kb que representa secuencias cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción estéril que se encuentran en células B antes del cambio al isotipo γ 1 (P. Sideras *et al.*, International Immunol. 1: 631 (1989)). Debido a que el transcrito está implicado en el inicio del cambio de isotipo y que las secuencias que actúan en cis cadena arriba son a menudo importantes para la regulación de la transcripción, estas secuencias se incluyen en construcciones transgénicas para promover una expresión correcta del transcrito estéril y la recombinación de cambio asociada.

4. pVGE1

El inserto pS γ 1-5' se escindió con SmaI y HindIII, se trató con enzima Klenow y se ligó con el enlazador oligonucleotídico siguiente:

5'- ccg gtc gac cgg -3' (SEC ID N°: 81)

El producto de ligación se digirió con Sall y se ligó con un pV2 digerido con Sall. El plásmido resultante, pVP, contiene 3,8 kb de secuencias flanqueantes 5' de cambio γ 1 unidas cadena abajo de los dos segmentos génicos variables humanos VH49.8 y VH4-21 (véase la Tabla 2). El inserto de pVP se aísla por digestión parcial con Sall y digestión completa con XhoI, seguido de purificación del fragmento de 15 kb en un gel de agarosa. Después, el inserto se clona en el sitio XhoI de p γ e2 para generar el clon de plásmido pVGE1 (Fig. 27). El pVGE1 contiene dos segmentos génicos variables de cadena pesada humana cadena arriba del gen constante γ 1 humano y de la región de cambio asociada. Puede usarse un sitio Sall único entre las regiones variable y constante para introducir por clonación segmentos génicos D, J y μ . El potenciador 3' de cadena pesada de rata se une al extremo 3' del gen γ 1 y el inserto completo se flanquea por sitios NotI.

5. pHC2

El clon de plásmido pVGE1 se digiere con Sall y el inserto XhoI de pIGM1 se clona en el mismo. El clon resultante, pHC2 (Fig. 25), contiene 4 segmentos de región variable humana funcional, al menos 8 segmentos D humanos, los 6 segmentos J_H humanos, el potenciador J-m humano, el elemento $\sigma\mu$ humano, la región de cambio μ humana, todos los exones codificantes de μ humana, el elemento $\Sigma\mu$ humano y la región constante γ 1 humana, incluyendo la región de cambio asociada y exones asociados con transcritos estériles, junto con secuencias flanqueantes de 4 kb cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción estéril. Estas secuencias humanas se unen al potenciador 3' de cadena pesada de rata de modo que todos los elementos de secuencia pueden aislarse en un solo fragmento a partir de secuencias del vector, por digestión con NotI, y microinyectarse en pronúcleos de embrión de ratón para generar animales transgénicos. Un sitio XhoI único en el extremo 5' del inserto puede usarse para introducir por clonación segmentos génicos variables humanos adicionales para ampliar adicionalmente la diversidad de recombinación de este minilocus de cadena pesada.

E. Ratones transgénicos

Los insertos NotI de los plásmidos pIGM1 y pHC1 se aislaron a partir de las secuencias de vector por electroforesis en gel de agarosa. Los insertos purificados se microinyectaron en los pronúcleos de embriones de ratón (C57BL/6 x CBA)F2 fertilizados y se transfirieron los embriones supervivientes a hembras pseudogestantes como se describe por Hogan *et al.* (B. Hogan, F. Costantini y E. Lacy, Methods of Manipulating the Mouse Embryo, 1986, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Los ratones que se desarrollaron a partir de embriones inyectados se analizaron para determinar la presencia de secuencias transgénicas por análisis de transferencia de Southern de ADN de la cola. Se estimó el número de copias de transgén por la intensidad de la banda respecto a patrones de control que contienen cantidades conocidas de ADN clonado. A las 3 a 8 semanas de edad, se aisló suero de estos animales y se ensayó para determinar la presencia de IgM e IgG1 humanas codificadas por transgén mediante ELISA, como se describe por Harlow y Lane (E. Harlow y D. Lane. Antibodies: A Laboratory Manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Se recubrieron pocillos de placa de microtitulación con anticuerpos monoclonales de ratón específicos para IgM humana (clon AF6, n° 0285, AMAC, Inc. Westbrook, ME) e IgG1 humana (clon JL512, n° 0280, AMAC, Inc. Westbrook, ME). Se realizaron diluciones seriadas de las muestras de suero en los pocillos y se detectó la presencia de inmunoglobulinas específicas con un anticuerpo de cabra anti-Ig humana (polivalente) conjugado con fosfatasa alcalina aislado por afinidad que se había preadsorbido para minimizar la reactividad cruzada con inmunoglobulinas de ratón. La Tabla 3 y la Fig. 28 muestran los resultados de un ensayo ELISA para determinar la presencia de IgM e IgG1 humana en el suero de dos animales que se desarrollaron a partir de embriones inyectados con el inserto transgénico del plásmido pHC1. Todos los ratones no transgénicos de control dieron un resultado de ensayo negativo para la expresión de IgM e IgG1 humana mediante este ensayo. Los ratones de dos líneas que contenían el inserto NotI de pIGM1 (líneas n° 6 y 15) expresan IgM humana pero no IgG1 humana. Se ensayaron ratones de 6 líneas que contenían el inserto de pHC1 y se descubrió que 4 de las líneas (líneas n° 26, 38, 57 y 122) expresan tanto IgM humana como IgG1 humana,

mientras que los ratones de dos de las líneas (líneas nº 19 y 21) no expresan niveles detectables de inmunoglobulinas humanas. Los ratones transgénicos pHCl que no expresaban inmunoglobulinas humanas se denominaron ratones G₀, que se desarrollaron directamente a partir de embriones microinyectados y pueden haberse sido mosaicos para la presencia del transgén. El análisis de transferencia de Southern indica que muchos de estos ratones contienen una o menos copias del transgén por célula. La detección de IgM humana en el suero de transgénicos pIGM1 y de IgM e IgG1 en transgénicos pHCl proporciona pruebas de que la secuencias transgénicas funcionan correctamente dirigiendo la unión VDJ, la transcripción y el cambio de isotipo. Uno de los animales (nº 18) era negativo para el transgén por análisis de transferencia de Southern y no mostraba niveles detectables de IgM o IgG1 humana. El segundo animal (nº 38), contenía aproximadamente 5 copias del transgén, según se ensayó por transferencia de Southern, y mostraba niveles detectables tanto de IgM como de IgG1 humana. Los resultados de ensayos ELISA para 11 animales que se desarrollaron a partir de embriones inyectados con transgén se resumen en la tabla a continuación (Tabla 3).

TABLA 3

Detección de IgM e IgG1 humana en el suero de animales transgénicos mediante ensayo ELISA

Nº animal	Transgén inyectado	Copias aproximadas de transgén por célula	IgM humana	IgG1 humana
6	pIGM1	1	++	-
7	pIGM1	0	-	-
9	pIGM1	0	-	-
10	pIGM1	0	-	-
12	pIGM1	0	-	-
15	pIGM1	10	++	-
18	pHC1	0	-	-
19	pHC1	1	-	-
21	pHC1	<1	-	-
26	pHC1	2	++	+
38	pHC1	5	++	+

La Tabla 3 muestra una correlación entre la presencia de ADN de transgén integrado y la presencia de inmunoglobulinas codificadas por transgén en el suero. Dos de los animales que se descubrió que contenían el transgén pHCl no expresaban niveles detectables de inmunoglobulinas humanas. Estos dos eran animales de bajo número de copias y podían no contener copias completas de los transgenes, o los animales podían haber sido mosaicos genéticos (indicado por el <1 copia por célula estimado para el animal nº 21), y las células que contienen el transgén puede que no hayan poblado el linaje hematopoyético. Como alternativa, los transgenes pueden haberse integrado en localizaciones genómicas que no conduzcan a su expresión. La detección de IgM humana en el suero de transgénicos pIGM1 y de IgM e IgG1 humana en transgénicos pHCl indica que las secuencias transgénicas funcionan correctamente dirigiendo la unión VDJ, la transcripción y el cambio de isotipo.

F. Clones de ADNc

Para evaluar la funcionalidad del transgén de pHCl en la unión VDJ y el cambio de clase, así como la participación del receptor de célula B humana codificado por el transgén en el desarrollo de células B y la exclusión alélica, se examinó la estructura de los clones de ADNc de inmunoglobulina obtenidos a partir de ARNm de bazo de ratón transgénico. Se examinó la diversidad global de las cadenas pesadas codificadas por transgén, centrándose en el uso de segmentos D y J, la adición de región N, la distribución de la longitud de CDR3 y la frecuencia de uniones que dan como resultado moléculas de ARNm funcionales. Se examinaron transcritos que codifican IgM e IgG que incorporan VH105 y VH251.

ES 2 345 580 T3

Se aisló ARN poliadenilado a partir de un ratón transgénico pHCI de línea 57 de segunda generación macho de once semanas de edad. Este ARN se usó para sintetizar ADNc monocatenario cebado con oligo-dT. El ADNc resultante se usó después como molde para cuatro amplificaciones por PCR individuales usando los cuatro oligonucleótidos sintéticos siguientes como cebadores: oligo-149 específico de VH251, cta gct cga gtc caa gga gtc tgt gcc gag gtg cag ctg (g,a,t,c) (SEC ID N°: 82); o-150 específico de VH105, gtt gct cga gtg aaa ggt gtc cag tgt gag gtg cag ctg (g,a,t,c) (SEC ID N°: 83); oligo-151 específico de gamma1 humana, ggc gct cga gtt cca cga cac cgt cac cgg ttc (SEC ID N°: 84); y oligo-152 específico de mu humana, cct gct cga ggc agc caa cgg cca cgc tgc tcg (SEC ID N°:85). La reacción 1 usaba los cebadores o-149 y o-151 para amplificar transcritos VH251-gamma1, la reacción 2 usaba o-149 y o-152 para amplificar transcritos VH251-mu, la reacción 3 usaba o-150 y o-151 para amplificar transcritos VH105-gamma1 y la reacción 4 usaba o-150 y o-152 para amplificar transcritos VH105-mu. Los productos de PCR 0,5 kb resultantes se aislaron a partir de un gel de agarosa. Los productos de transcrito μ eran más abundantes que los productos de transcrito γ , concordando con los datos de ELISA correspondientes (Fig. 34). Los productos de PCR se digirieron con XhoI y se clonaron en el plásmido pNN03. Se aisló ADN plasmídico bicatenario a partir de minipreparaciones de nueve clones de cada una de las cuatro amplificaciones por PCR y se realizaron reacciones de secuenciación didesoxi. Dos de los clones resultaron ser deleciones que no contenían segmentos D o J. Estos no podían haberse obtenido a partir de productos de corte y empalme de ARN normales y probablemente se han originado a partir de deleciones introducidas durante la amplificación por PCR. Una de las muestras de ADN resultó ser una mezcla de dos clones individuales y tres clones adicionales no producían una secuencia de ADN legible (presumiblemente porque las muestras de ADN no estaban lo bastante limpias). Las secuencias de ADN de las uniones VDJ de los 30 clones restantes se recopilan en la Tabla 4. Cada una de las secuencias es única, indicando que ninguna sola ruta de reorganización génica o solo clon de células B de expresión de transgén es dominante. El hecho de que ningunas dos secuencias sean iguales también es un indicio de la gran diversidad de inmunoglobulinas que pueden expresarse a partir de un minilocus compacto que contiene sólo 2 segmentos V, 10 segmentos D y 6 segmentos J. Ambos segmentos V, los 6 segmentos J y 7 de los 10 segmentos D que se incluyen en el transgén se usan en las uniones VDJ. Además, ambos genes de región constante (mu y gamma1) se incorporan en los transcritos. El cebador VH105 resultó no ser específico para VH105 en las reacciones realizadas. Por lo tanto, muchos de los clones de las reacciones 3 y 4 contenían transcritos de VH251. Además, los clones aislados a partir del producto de PCR de la reacción 3 ligado resultaron codificar IgM más que IgG; sin embargo, esto puede reflejar una contaminación con producto de PCR de la reacción 4 ya que el ADN se aisló en el mismo gel. Un experimento análogo, en el que se amplificaron secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina a partir de linfocitos de sangre periférica humana adulta (PBL) y se determinó la secuencia de ADN de las uniones VDJ, se describió recientemente por Yamada *et al.* (J. Exp. Med. 173:395-407 (1991), que se incorpora en la presente memoria como referencia). Se compararon los datos de PBL humanos con los datos del ratón transgénico pHCI.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

TABLA 4 (SEC ID Nº: 86-115)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

				V	n-D-n	J	C
1	VH251	DHQ52	J3	γ1	TACTGTGCCGAGA	<u>CGGCTAACTGGGGTTGAT</u>	GCTTTTGATATCTGGGGCCAAAGGGAC AATGGTCACCGTCTCTTCAG CCTCCAC CAAG
2	VH251	DN1	J4	γ1	TACTGTGCCGAGA	<u>CACCGTATAGCAGCAGCTGG</u>	CTTTGACTACTGGGGCCAGGSAACCC TGTCACCGTCTCCTCAG CCTCCAC CAAG
3	VH251	D?	J6	γ1	TACTGTGCCGAGA	<u>I</u>	ATTACTACTACTACCGGTATGGACG TCTGGGCCAAAGGACCACGGTCACC CAAG GTCTCCTCAG
4	VH251	DXP1	J6	γ1	TACTGTGCCGAGA	<u>CATTACGATATTTGACTGGTC</u>	CTACTACTATGGACGTCTGGGGCC AAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA CAAG
5	VH251	DXP1	J4	γ1	TACTGTGCCGAGA	<u>CGGAGGTACTATGGTTCCGGGGAGTTA</u> <u>TTATAACGI</u>	CTTTGACTACTGGGGCCAGGGAMCCC TGGTCACCGTCTCCTCAG CCTCCAC CAAG
6	VH251	D?	J3	γ1	TACTGTGCCGAGA	<u>CGGGGGGTGTGTGAT</u>	GCTTTTGATATCTGGGGCCAAAGGGAC AATGGTCACCGTCTCCTCAG CAAG
7	VH251	DHQ52	J3	μ	TACTGTGCCGAGA	<u>GCAATGGC</u>	GCTTTTGATATCTGGGGCCAAAGGGAC AATGGTCACCGTCTCCTCAG GGAGTGC ATCC
8	VH251	DHQ52	J6	μ	TACTGTGCCGAGA	<u>ICGGCTAACTGGGGATC</u>	CTACTACTACTACCGGTATGGACGTCTG GGGCCAAAGGACCACGGTCACCGTCT ATCC CCTCAG
9	VH251	--	J1	μ	TACTGTGCCGAGA		TACTCCAGCATGGGGCCAGGGCCACC CTGGTCACCGTCTCCTCAG GGAGTGC GTCC
10	VH251	DLR2	J4	μ	TACTGTGCCGAGA	<u>CACGTAGCTAACTCT</u>	TTTGACTACGGGGCCAGGGAAACCCTG GTCACCGTCTCCTCAG GGAGTGC ATCC
11	VH251	DXP1	J4	μ	TACTGTGCCGAGA	<u>CAAAITACTATGGTTCCGGGGAGTTCC</u>	CTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCC TGGTCACCGTCTCCTCAG GGAGTGC ATCC
12	VH251	D?	J1	μ	TACTGTGCCGAGA	<u>C</u>	AATACTCCAGCACCTGGGGCCAGGGCC ACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG ATCC
13	VH251	DHQ52	J6	μ	TACTGTGCCGAGA	<u>CAAACTGGG</u>	ACTACTACTACTACGGGTATGGACGTCT GGGCCAAAGGACCACGGTCACCGTCT ATCC TCCTCAG
14	VH251	DXP1	J6	μ	TACTGTGCCGAGA	<u>CATTACTATGGTTCCGGGGAGTTATG</u>	ACTACTACTACTACGGGTATGGACGTCT GGGCCAAAGGACCACGGTCACCGTCT ATCC TCCTCAG

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continuación)

		V	n-D-n	J	C			
15	VH251	DXP1	J4	γ1	TACTGTGGGAGA	<u>GAGGGAG</u>	TGGGGCCAGGGAGCCCTGGTCACCGT CTCCTCAG	CCTCCAC CAAG
16	VH105	DXP1	J5	μ	TACTGTGGGAGA	<u>TTCJGGGAG</u>	ACTGGTTCGACCCCTGGGCCAAGGGA ACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG	GGAGTGC ATCC
17	VH251	DXP1	J4	γ1	TACTGTGGGAGA	<u>CGGAGGTA</u> CTATGGTTCGGGGAGTTAT TATAADGI	CTTTGACTACTGGGGCCAGCCAAACC TGGTCACCGTCTCCTCAG	CCTCCAC CAAG
18	VH251	DH052	J4	γ1	TACTGTGGGAGA	<u>CAAACTGGGGAGGA</u>	GACTACTGGGGCCAGGGAAACCCTGGT CACCGTCTCCTCAG	CCTCCAC CAAG
19	VH251	DK1	J6	γ1	TACTGTGGGAGA	<u>GGATATAGTGGCTACGATA</u>	ACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGG CCCAACGGACCACCGTACCCGCTCC TCAG	CCTCCAC CAAG
20	VH251	DH052	J4	μ	TACTGTGGGAGA	<u>CAAMCTGGGGAGG</u>	ACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGA ACCTGGTACACCGTCTCCTCAG	CGAGTGC ATCC
21	VH251	DK1	J2	γ1	TACTGTGGGAGA	<u>TATAGTGGCTACGATTAC</u>	CTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCC GTGGCACCCCTGGTCACTGTCCCTCAG	CCTCCAC CGAG
22	VH251	DIR2	J6	γ1	TACTGTGGGAGA	<u>GCATCCCTCCCTTCCTTIG</u>	ACTACTACGGTATGGAGTCTGGGGC CAAGGGACCAGGTCACCGTCTCCTCA G	CCTCCAC CAAG
23	VH251	DIR2	J4	μ	TACTGTGGGAGA	<u>CGGGGTGGGG3</u>	TTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCCTG GTCACCGTCTCCTCAG	GGAGTGC ATCC
24	VH105	D?	J6	μ	TACTGTGTG	<u>CCGGTCGAAACT</u>	TTACTACTACTACTACGGTATGGACCT CTGGGGCCAAAGSACCACGGTCAACC TCTCCAG	GGAGTGC ATCC
25	VH105	DXP1	J4	μ	TACTGTGTGAGA	<u>GATATTTTGACTGGTTAACG</u>	TGACTACTGGGGCCAGGGAAACCCTGG TCACCGTCTCCTCAG	GGAGTGC ATCC
26	VH251	DN1	J3	μ	TACTGTGGGAGA	<u>CATGGTATAGCAGCAGCTGGTAC</u>	TGCTTTTGATATCTGGGGCCAAAGGAC CAATGGTACCGTCTCTTTCAG	GGAGTGC ATCC
27	VH105	DH052	J3	μ	IACIGTGGGAGA	<u>ICAACCTGGGGITG</u>	ATGCTTTTGAATCTGGGGCCAAAGGGA CAATGGTACCGTCTCTTTCAG	GGAGTGC ATCC
28	VH251	DN	J4	μ	TACTGTGGG	<u>GAAATAGCAGCAGCTGCC</u>	CTACTTTGACTACTGGGGCCACCGGAA CCCTGGTACACCGTCTCCTCAG	GGAGTGC ATCC
29	VH105	DN1	J4	μ	TACTGTGTG	<u>TGATAGCAGCAGCTGGTAAGGAAAC</u> GG	CTACTGGGGCCAGGGAAACCCTGGTCA CCGTCCTCCTCAG	GGACTGC ATCC
30	VH251	DH052	J4	μ	TACTGTGGGAGA	<u>CAAACTGGGG</u>	TGACTACTGGGGCCAGGGAAACCCTGG TCACCGTCTCCTCAG	GGAGTGC ATCC

G. Elección de segmento J

La Tabla 5 comparaba la distribución de segmentos J incorporados en transcritos codificados por transgén pHCl1 respecto a segmentos J encontrados en transcritos de inmunoglobulina de PBL humanos adultos. Los perfiles de distribución eran muy similares, J4 es el segmento dominante en ambos sistemas, seguido de J6. J2 es el segmento menos común en PBL humanos y en el animal transgénico.

TABLA 5

Elección de Segmento J

Segmento J	Porcentaje de uso ($\pm 3\%$)	
	Transgénico HCl	PBL Humanos
J1	7	1
J2	3	<1
J3	17	9
J4	44	53
J5	3	15
J6	26	22
	100%	100%

H. Elección de segmento D

El 49% (40 de 82) de los clones analizados por Yamada *et al.* incorporaban segmentos D que se incluían en el transgén pHCl1. 11 clones adicionales contenían secuencias que no se asignaron por los autores a ninguno de los segmentos D conocidos. Dos de estos 11 clones sin asignar parecen proceder de una inversión de los segmentos DIR2 que se incluye en la construcción pHCl1. Este mecanismo, que se predijo por Ichihara *et al.* (EMBO J. 7:4141 (1988)) y se observó por Sanz (J. Immunol. 147:1720-1729 (1991)), no se consideró por Yamada *et al.* (J. Exp. Med. 173:395-407 (1991)). La Tabla 5 es una comparación de la distribución de segmentos D para el ratón transgénico pHCl1 y de la observada para transcritos de PBL humanos por Yamada *et al.* Los datos de Yamada *et al.* se volvieron a recopilar para incluir el uso de DIR2 y excluir segmentos D que no están en el transgén de pHCl1. La Tabla 6 demuestra que la distribución de la incorporación de segmentos D es muy similar en el ratón transgénico y en PBL humanos. Los dos segmentos D dominantes, DXP'1 y DN1, también se encuentran con gran frecuencia en el ratón transgénico. La diferencia más espectacular entre las dos distribuciones es la alta frecuencia de DHQ52 en el ratón transgénico en comparación con el ser humano. La alta frecuencia de DHQ52 es una reminiscencia de la distribución de segmentos D en el hígado fetal humano. Sanz ha observado que el 14% de los transcritos de cadena pesada contenían secuencias DHQ52. Si se excluyen del análisis los segmentos D que no se encuentran en pHCl1, el 31% de los transcritos fetales analizados por Sanz contienen DHQ52. Esto es comparable al 27% que se observa en el ratón transgénico pHCl1.

ES 2 345 580 T3

TABLA 6
Elección de Segmento D

5

		Porcentaje de uso ($\pm 3\%$)	
	Segmento D	Transgénico HCl	PBL Humanos
10	DLR1	<1	<1
	DXP1	3	6
	DXP'1	25	19
15	DA1	<1	12
	DK1	7	12
20	DN1	12	22
	DIR2	7	4
	DM2	<1	2
25	DLR2	3	4
	DHQ52	26	2
30	?	17	17
		100%	100%

35

I. Funcionalidad de uniones VDJ

La Tabla 7 muestra las secuencias de aminoácidos esperadas de las regiones VDJ de 30 clones que se analizaron a partir del transgénico pHCl. Las secuencias traducidas indican que 23 de las 30 uniones VDJ (77%) están en fase de lectura respecto a los segmentos J y variable.

40

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 345 580 T3

TABLA 7

Funcionalidad de Uniones V-D-J (SEC ID N°: 116-145)

					FR3	CDR3	FR4	
5	1	VH251	DHQ52	J3	γ1	YCAR	RLTGVDAFDI	WGQGTMTVSSASTK
10	2	VH251	DN1 J4	J4	γ1	YCAR	HRIAAAGFDY	WGQGLTVTVSSASTK
	3	VH251	D? J6	J6	γ1	YCAR	YYYYYGMDV	WGQGTTVTVSSASTK
	4	VH251	DXP'1	J6	γ1	YCAR	HYDILTGPTTTTWTSGAKGPRSPSPQPPP	
	5	VH251	DXP'1	J4	γ1	YCAR	RRYYGSGSYYNVTFDY	WGQGLTVTVSSASTK
15	6	VH251	D?	J3	γ1	YCAR	RGVSDAFDI	WGQGTMTVTVSSASTK
	7	WH251	DHQ52	J3	μ	YCAR	ATGAFDI	WGQGTMTVTVSSGSAS
	8	VH251	DHQ52	J6	μ	YCAR	SANWGSYYYYGMDV	WGQGTTVTVSSGSAS
	9	WH251	--	J1	μ	YCAR	YFQH	WGQGLTVTVSSGSAS
20	10	WH251	DLR2	J4	μ	YCAR	HVANSFDY	WGQGLTVTVSSGSAS
	11	VH251	DXP'1	J4	μ	YCAR	QITMVRGVVDFDY	WGQGLTVTVSSGSAS
	12	VH251	D?	J1	μ	YCAR	QYFQH	WGQGLTVTVSSGSAS
	13	WH251	DHQ52	J6	μ	YCAR	QTGDYYYYGMDV	WGQGTTVTVSSGSAS
25	14	VH251	DXP'1	J6	μ	YCAR	HYYGSGSYDYGGMDV	WGQGTTVTVSSGSAS
	15	VH251	DXP'1	J4	γ1	YCVR	QGVGPGNPGHRLLSLHQ	
	16	VH105	DXP'1	J5	μ	YCAR	FWETGSTPGAREPWSPSPQGVH	
	17	VH251	DXP'1	J4	γ1	YCAR	RRYYGSGYYNVFDY	WGQGLTVTVSSASTK
30	18	VH251	DHQ52	J4	γ1	YCAR	QTWGGDY	WGQGLTVTVSSASTK
	19	VH251	DPQ	J6	γ1	YCAR	GYSGYDNYYYYGIHV	WGQGTTVTVSSASTK
	20	VH251	DHQ52	J4	μ	YCAR	QTGEDYFDY	WGQGLTVTVSSGSAS
	21	VH251	DK1	J2	μ	YCAR	YSGYDYLLVLRSLGPWHPGHCLLSLHR	
35	22	VH251	DIR2	J6	γ1	YCAR	ASLPSFDYYGMDV	WGQGTTVTVSSASTK
	23	VH251	DIR2	J4	μ	YCAR	RGGGLTTGAREPWSPSPQGVH	
	24	VH105	D?	H6	μ	YCVR	VETLLLLLRYGRLGPRDHGHRLRECI	
	25	VH105	DXP1	J4	μ	YCVR	DILTGXPDY	WGQGLTVTVSSGSAS
40	26	VH251	DN1	J3	μ	YCAR	HGIAAAGTAFDI	WGQGTMTVTVSSGSAS
	27	VH105	DHQ52	J3	μ	YCVR	STGVDAFDI	WGQGTMTVTVSSGSAS
	28	VH251	DN1	J4	μ	YCAE	IAAAALLXLLGPGNPGHRLRECI	
	29	VH105	DN1	J4J	μ	YCVR	IAAAGKNGY	WGQGLTVTVSSGSAS
45	30	VH251	DHQ52	J4	μ	YCAR	QNWGDY	WGQGLTVTVSSGSAS

J. Distribución de longitud de CDR3

50 La Tabla 8 comparaba la longitud de los péptidos CDR3 de transcritos con uniones VDJ en fase de lectura en el
 55 ratón transgénico pHCl con la de PBL humanos. De nuevo, los datos de PBL humanos vienen de Yamada *et al.* Los
 perfiles son similares con el perfil del transgénico desviado ligeramente hacia péptidos CDR3 de menor tamaño que
 los observados de PBL humanos. La longitud promedio de CDR3 en el ratón transgénico es de 10,3 aminoácidos. Ésta
 es sustancialmente la misma que el tamaño promedio descrito para péptidos CDR3 humanos auténticos por Sanz (J.
 Immunol. 147: 1720-1729 (1991)).

ES 2 345 580 T3

TABLA 8

Distribución de la Longitud de CDR3

	Porcentaje de Aparición ($\pm 3\%$)		
Nº aminoácidos en CDR3	Transgénico HCl	PBL humanos	
5	3-8	26	14
	9-12	48	41
10	13-23	<1	7
15	>23	<1	1
		100%	100%
20			

Ejemplo 13

25 *Transgenes de Cadena Pesada Reorganizados*

A. Aislamiento de Segmentos VDJ de Cadena Pesada Humana Reorganizados

30 Se exploraron dos bibliotecas de ADN genómico de leucocitos humanos clonadas en el vector de fago λ EMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) con un fragmento PacI/HindIII de 1 kb de λ 1.3 que contiene el potenciador intrónico J- μ de cadena pesada humana. Los clones positivos se ensayaron para determinar la hibridación con una mezcla de los oligonucleótidos específicos de V_H siguientes:

35

oligo-7

5'- tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc

40

ttc acc-3' (SEC ID N°: 146)

oligo-8

5'- tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc

45

ttc agt-3' (SEC ID N°:147)

50 Los clones que hibridaban con sondas tanto V como J- μ se aislaron y se determinó la secuencia de ADN del segmento VDJ reorganizado.

B. Construcción de transgenes de cadena pesada humana reorganizada

55

Se subclonaron fragmentos que contenían segmentos VJ funcionales (fase de lectura abierta y señales de corte y empalme) en el vector plasmídico pSP72 de modo que el sitio XhoI derivado del plásmido sea adyacente al extremo 5' de la secuencia del inserto. Un subclón que contenía un segmento VDJ funcional se digirió con XhoI y PacI (PacI, una enzima de corte poco frecuente, reconoce un sitio próximo al potenciador intrónico J-m) y el inserto se clonó en pH2 digerido con XhoI/PacI para generar una construcción transgénica con un segmento VDJ funcional, el potenciador intrónico J- μ , el elemento de cambio μ y los exones codificantes de región constante μ y la región constante $\gamma 1$, incluyendo las secuencias asociadas a transcritos estériles, el cambio $\gamma 1$ y los exones codificantes. Esta construcción transgénica se escinde con NotI y se microinyecta en los pronúcleos de embriones de ratón para generar animales transgénicos como se ha descrito anteriormente.

65

ES 2 345 580 T3

Ejemplo 14

Transgenes de Cadena Ligera

5 A. Construcción de Vectores Plasmídicos

1. Vector plasmídico pGP1c

El vector plasmídico pGP1a se digiere con NotI y se ligan en el mismo los oligonucleótidos siguientes:

10

oligo-81

5'-ggc cgc atc ccg ggt ctc gag gtc gac aag ctt tcg

15

agg atc cgc-3' (SEC ID N°: 148)

oligo-82

5'-ggc cgc gga tcc tcg aaa gct tgt cga cct cga gac

20

ccg gga tgc-3' (SEC ID N°: 149)

25 El plásmido resultante, pGP1c contiene un polienlazador con sitios de restricción XmaI, XhoI, Sall, HindIII y BamHI flanqueados por sitios NotI.

2. Vector plasmídico pGP1d

El vector plasmídico pGP1a se digirió con NotI y se ligaron en el mismo los oligonucleótidos siguientes:

30

oligo-87

5'- ggc cgc tgt cga caa gct tat cga tgg atc ctc gag

35

tgc -3' (SEC ID N°: 150)

oligo-88

5'-ggc cgc act cga gga tcc atc gat aag ctt gtc gac

40

agc -3' (SEC ID N°: 151)

45 El plásmido resultante, pGP1d contiene un polienlazador con los sitios de restricción Sall, HindIII, ClaI, BamHI y XhoI flanqueados por sitios NotI.

B. Aislamiento de clones Jk y Ck

50 Se exploró una biblioteca de ADN genómico placentario humano clonada en el vector de fago λ EMBL3/SP6/T7 (Clonotech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) con el oligonucleótido específico de región J de cadena ligera kappa humana:

55

oligo-36

5'- cac ctt cgg cca agg gac acg act gga gat taa acg

taa gca -3' (SEC ID N°: 152)

60

65 y se aislaron los clones de fago 136.2 y 136.5. Un fragmento XhoI de 7,4 kb que incluye el segmento Jk1 se aisló de 136.2 y se subclonó en el plásmido pNN03 para generar el clon de plásmido p36.2. Un fragmento XhoI de 13 kb vecino que incluye los segmentos Jk 2 a 5 junto con el segmento génico C_k se aisló del clon de fago 136.5 y se subclonó en el plásmido pNNO3 para generar el clon de plásmido p36.5. Juntos, estos dos clones abarcan la región que comienza 7,2 kb cadena arriba de Jk1 y termina 9 kb cadena abajo de C_k.

ES 2 345 580 T3

C. Construcción de transgenes de cadena ligera reorganizada

1. pCK1, un vector C κ para expresar segmentos variables reorganizados

5 El inserto XhoI de 13 kb del clon de plásmido p36.5 que contiene el gen C κ junto con 9 kb de secuencias cadena abajo se clona en el sitio SalI del vector plasmídico pGP1c con el extremo 5' del inserto adyacente al sitio XhoI del plásmido. El clon resultante, pCK1 puede aceptar fragmentos clonados que contienen segmentos VJ κ reorganizados en el sitio XhoI 5' único. El transgén puede escindir-se después con NotI y purificarse a partir de secuencias de vector por electroforesis en gel. La construcción transgénica resultante contendrá el potenciador intrónico J-C κ humano y
10 puede contener el potenciador κ 3' humano.

2. pCK2, un vector C κ con potenciadores de cadena pesada para expresar segmentos variables reorganizados

15 Un fragmento XbaI de 0,9 kb de ADN genómico de ratón que contenía el potenciador intrónico J- μ de cadena pesada de ratón (J. Banerji *et al.*, Cell 33: 729-740 (1983)) se subclonó en pUC18 para generar el plásmido pJH22.1. Este plásmido se linealizó con SphI y los extremos se rellenaron con la enzima Klenow. El ADN tratado con Klenow se digirió después con HindIII y un fragmento MluI/HindIII de 1,4 kb del clon de fago λ 1.3 (ejemplo anterior), que contenía el potenciador intrónico J- μ de cadena pesada humana (Hayday *et al.*, Nature 307:334-340 (1984)), con él. El
20 plásmido resultante, pMHE1, consiste en los potenciadores intrónicos J- μ de cadena pesada humana y de ratón ligados entre sí en pUC18 de modo que se escinden en un solo fragmento BamHI/HindIII. Este fragmento de 2,3 kb se aísla y se clona en pGP1c para generar pMHE2. El pMHE2 se digiere con SalI y el inserto XhoI de 13 kb de p36.5 se clona en el mismo. El plásmido resultante, pCK2, es idéntico a pCK1 excepto por que los potenciadores intrónicos J- μ de cadena pesada humana y de ratón se fusionan con el extremo 3' del inserto transgénico. Para modular la expresión
25 del transgén final, pueden generarse construcciones análogas con diferentes potenciadores, es decir, el potenciador de cadena pesada o kappa 3' de rata o de ratón (Meyer y Neuberger, EMBO J., 8: 1959-1964 (1989); Petterson *et al.*, Nature, 344: 165-168(1990)).

3. Aislamiento de segmentos variables de cadena ligera kappa reorganizados

Dos bibliotecas de ADN genómico de leucocitos humanos clonadas en el vector de fago λ EMBL3/SP6/T7 (Clon-
netech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) se exploraron con el fragmento XhoI/SmaI de 3,5 kb de p36.5 que contenía
35 la región J de cadena ligera kappa humana. Los clones positivos se ensayaron para determinar la hibridación con los oligonucleótidos específicos de V κ siguientes:

oligo-65 5'-agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc-3'

40 (SEC ID N°: 153)

Los clones que hibridaban con ambas sondas V y J se aislaron y se determinó la secuencia de ADN del segmento
45 VJ κ reorganizado.

4. Generación de ratones transgénicos que contienen construcciones de cadena ligera humana reorganizada

Se subclonaron fragmentos que contienen segmentos VJ funcionales (fase de lectura abierta y señales de corte y
50 empalme) en los sitios XhoI únicos de los vectores pCK1 y pCK2 para generar transgenes de cadena ligera kappa reorganizada. Las construcciones transgénicas se aíslan a partir de secuencias de vector por digestión con NotI. Un inserto purificado en gel de agarosa se microinyecta en pronúcleos de embriones de ratón para generar animales transgénicos. Los animales que expresan cadena kappa humana se cruzan con animales transgénicos que contienen minilocus de cadena pesada para generar ratones que expresen anticuerpos totalmente humanos.

55 Debido a que no todas las combinaciones VJ κ pueden ser capaces de formar complejos de cadena ligera-pesada estables con un amplio espectro de combinaciones VDJ de cadena pesada diferentes, se generan varias construcciones transgénicas de cadena ligera diferentes, usando cada una un clon VJ κ reorganizado diferente, y los ratones transgénicos que se obtienen como resultado de estas construcciones se cruzan con ratones que expresan transgén de minilocus de cadena pesada. Se aíslan linfocitos de sangre periférica, bazo y ganglio linfático de animales dobles transgénicos
60 (ambas construcciones de cadena ligera y pesada), se tiñen con anticuerpos fluorescentes específicos para inmunoglobulinas de cadena ligera y pesada de ratón y humanas (Pharmingen, San Diego, CA) y se analizan por citometría de flujo usando un analizador FACScan (Becton Dickinson, San José, CA). Las construcciones de transgenes de cadena ligera reorganizada que dan como resultado el mayor nivel de complejos de cadena ligera/pesada humana en la superficie del mayor número de células B y no afectan desfavorablemente al compartimento de células inmunes (según se
65 ensayó por análisis citométrico de flujo con anticuerpos específicos de subconjunto de células C y D) se seleccionan para la generación de anticuerpos monoclonales humanos.

ES 2 345 580 T3

D. Construcción de transgenes de minilocus de cadena ligera no reorganizada

1. *pJCK1*, un vector que contiene *J κ* , *C κ* para construir transgenes de minilocus

5 El inserto XhoI de p36.5 que contiene *C κ* de 13 kb se trata con la enzima Klenow y se clona en plásmido pGP1d tratado con Klenow digerido con HindIII. Se selecciona un clon de plásmido de modo que el extremo 5' del inserto sea adyacente al sitio ClaI derivado del vector. El plásmido resultante, p36.5-1d, se digiere con ClaI y se trata con Klenow. El inserto XhoI de 7,4 kb que contiene *J κ* 1 de p36.2 se trata después con Klenow y se clona en el p36.5-1d tratado con Klenow y con ClaI. Se selecciona un clon en el que el inserto de p36.2 está en la misma orientación que el inserto p36.5. Este clon, pJCK1 (Fig. 34), contiene la región *J κ* humana completa y *C κ* junto con 7,2 kb de secuencias cadena arriba y 9 kb de secuencias cadena abajo. El inserto también contiene el potenciador intrónico J-*C κ* humano y puede contener un potenciador κ 3' humano. El inserto está flanqueado por un sitio Sall 3' único con el fin de clonar secuencias flanqueantes 3' adicionales tales como potenciadores de cadena ligera o cadena pesada. Un sitio XhoI único se localiza en el extremo 5' del inserto con el fin de clonar en el mismo segmentos génicos *V κ* no reorganizados. Los sitios Sall y XhoI únicos están a su vez flanqueados por sitios NotI que se usan para aislar la construcción transgénica completada a partir de las secuencias de vector.

2. Aislamiento de segmentos génicos *V κ* no reorganizados y generación de animales transgénicos que expresan proteína de cadena ligera de *Ig* humana

20 El oligonucleótido específico de *V κ* , oligo-65 (analizado anteriormente), se usa para sondear una biblioteca de ADN genómico placentario humano clonada en el vector de fago IEMBL3/SP6/T7 (Clonotech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA). Los segmentos génicos variables de los clones resultantes se secuencian y los clones que parecen funcionales se seleccionan. Los criterios para juzgar la funcionalidad incluyen: fases de lectura abierta, secuencias donadoras yceptoras de corte y empalme intactas, secuencias de recombinación intactas. Los fragmentos de ADN que contienen segmentos génicos variables seleccionados se clonan en el sitio XhoI único del plásmido pJCK1 para generar construcciones de minilocus. Los clones resultantes se digieren con NotI y los insertos se aíslan y se inyectan en pronúcleos de embriones de ratón para generar animales transgénicos. Los transgenes de estos animales experimentarán la unión V a J en células B en desarrollo. Los animales que expresen cadena kappa humana se cruzan con animales transgénicos que contienen minilocus de cadena pesada para generar ratones que expresen anticuerpos totalmente humanos.

Ejemplo 15

35 *Transgén de Ig Humana de Cadena Pesada Genómico*

Este Ejemplo describe la clonación de un transgén de inmunoglobulina de cadena pesada genómico humano que después se introduce en la línea germinal murina por microinyección en cigotos o integración en células ES.

40 Se aíslan núcleos de tejido placentario humano recién obtenido como se describe por Marzluff, W. F., *et al.* (1985), *Transcription and Translation: A Practical Approach*, B. D. Hammes y S. J. Higgins, eds., págs. 89-129, IRL Press, Oxford). Los núcleos aislados (o espermatozoides humanos lavados con PBS) se embeben en bloques de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5% y se lisan con proteinasa K 1 mg/ml en EDTA 500 mM, SDS al 1% para los núcleos, o con proteinasa K 1 mg/ml en EDTA 500 mM, SDS al 1%, DTT 10 mM para los espermatozoides a 50°C durante 18 horas. La proteinasa K se inactiva por incubación de los bloques en PMSF 40 μ g/ml en TE durante 30 minutos a 50°C y después se lavan exhaustivamente con TE. El ADN se digiere después en la agarosa con la enzima de restricción NotI como se describe por M. Finney en *Current Protocols in Molecular Biology* (F. Ausubel *et al.*, eds. John Wiley & Sons, Sup. 4, 1988, por ejemplo, Sección 2.5.1).

50 El ADN digerido con NotI se fracciona después mediante electroforesis en gel de campo pulsado como se describe por Anand *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 17: 3425-3433 (1989). Las fracciones enriquecidas para el fragmento NotI se ensayan por hibridación de Southern para detectar una o más de las secuencias codificadas por este fragmento. Dichas secuencias incluyen los segmentos D de cadena pesada, segmentos J y regiones constantes γ 1, junto con representantes de las 6 familias *V_H* (aunque este fragmento se identifica como un fragmento de 670 kb de células HeLa por Berman *et al.* (1988), anteriormente, se ha descubierto que es un fragmento de 830 kb de ADN de esperma y placenta humana). Las fracciones que contienen este fragmento NotI se ligan en el sitio de clonación NotI del vector pYACNN como se describe (McCormick *et al.*, *Technique* 2: 65-71 (1990)). Se prepara el plásmido pYACNN por digestión de pYACneo (Clontech) con EcoRI y ligación en presencia del oligonucleótido 5'- AAT TGC GGC CGC -3' (SEC ID N°: 25).

60 Los clones de YAC que contienen el fragmento NotI de cadena pesada se aíslan como se describe por Traver *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 5898-5902 (1989). El inserto NotI clonado se aísla del ADN de levadura de alto peso molecular por electroforesis en gel de campo pulsado como se describe por M. Finney, en la obra citada. El ADN se condensa por adición de espermina 1 mM y se microinyecta directamente en el núcleo de embriones de una sola célula previamente descritos. Como alternativa, el ADN se aísla mediante electroforesis en gel de campo pulsado y se introduce en células ES por lipofección (Gnirke *et al.*, *EMBO J.* 10: 1629-1634 (1991)), o el YAC se introduce en células ES por fusión de esferoplastos.

ES 2 345 580 T3

Ejemplo 16

Transgén de Ig de Cadena Pesada Genómico Discontinuo

5 Un fragmento SpeI de 85 kb de ADN genómico humano, que contiene V_H6 , segmentos D, segmentos J, la región constante μ y parte de la región constante γ , se ha aislado por clonación de YAC esencialmente como se describe en el Ejemplo 1. Un YAC que lleva un fragmento de la región variable de la línea germinal, tal como un fragmento NotI de 570 kb cadena arriba del fragmento NotI de 670-830 kb descrito anteriormente, que contiene múltiples copias de V_1 a V_5 , se aísla como se describe (Berman *et al.* (1988), anteriormente, detectaron dos fragmentos NotI de 530 kb, 10 conteniendo cada uno múltiples segmentos V). Los dos fragmentos se coinyectan en el núcleo de un embrión de ratón de una sola célula como se describe en el Ejemplo 1.

Típicamente, la coinyección de dos fragmentos de ADN diferentes da como resultado la integración de ambos fragmentos en el mismo sitio de inserción dentro del cromosoma. Por lo tanto, aproximadamente el 50% de los 15 animales transgénicos resultantes que contienen al menos una copia de cada uno de los dos fragmentos tendrá el fragmento del segmento V insertado cadena arriba del fragmento que contiene la región constante. De estos animales, aproximadamente el 50% realizará la unión de V a DJ por inversión de ADN y aproximadamente el 50% por delección, dependiendo de la orientación del fragmento NotI de 570 kb respecto a la posición del fragmento SpeI de 85 kb. Se aísla el ADN de los animales transgénicos resultantes y los animales que se descubre que contienen ambos transgenes por 20 hibridación de transferencia de Southern (específicamente, aquellos animales que contienen tanto múltiples segmentos V humanos como genes de región constante humana) se ensayan para determinar su capacidad para expresar moléculas de inmunoglobulina humana de acuerdo con técnicas convencionales.

Ejemplo 17

Identificación de secuencias de región variable funcionalmente reorganizadas en células B transgénicas

30 Un antígeno de interés se usa para inmunizar (véase Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nueva York (1988)) un ratón con los rasgos genéticos siguientes: genotipo homocigoto en el locus de cadena endógena para una delección de J_H (Ejemplo 10); hemicigoto para una sola copia de transgén de minilocus de cadena pesada humana no reorganizada (ejemplos 5 y 14); y hemicigoto para una sola copia de un transgén de cadena ligera kappa humana reorganizada (Ejemplos 6 y 14).

35 Después del programa de inmunización, se extirpa el bazo y las células de bazo se usan para generar hibridomas. Se usan células de un clon de hibridoma individual que secreta anticuerpos reactivos con el antígeno de interés para preparar ADN genómico. Una muestra del ADN genómico se digiere con varias enzimas de restricción diferentes que reconocen secuencias de seis pares de bases únicas y se fracciona en un gel de agarosa. Se usa hibridación de 40 transferencia de Southern para identificar dos fragmentos de ADN en el intervalo de 2-10 kb, conteniendo uno de ellos la única copia de las secuencias VDJ de cadena pesada humana reorganizada y conteniendo uno de ellos la única copia de la secuencia VJ de cadena ligera humana reorganizada. Estos dos fragmentos se fraccionan por tamaño en un gel de agarosa y se clonan directamente en pUC18. Los insertos clonados se subclonan después respectivamente en casetes de expresión de cadena pesada y ligera que contienen secuencias de región constante.

45 El clon de plásmido p γ e1 (Ejemplo 12) se usa como casete de expresión de cadena pesada y se clonan secuencias VDJ reorganizadas en el sitio XhoI. El clon de plásmido pCK1 se usa como casete de expresión de cadena ligera y se clonan secuencias VJ reorganizadas en el sitio XhoI. Los clones resultantes se usan juntos para transfectar células SP₀ para producir anticuerpos que reaccionen con el antígeno de interés. (Co. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2869 (1991), que se incorpora en la presente memoria como referencia).

50 Como alternativa, se aísla el ARNm de las células de hibridoma clonadas descritas anteriormente y se usa para sintetizar ADNc. La secuencia VDJ y VJ de cadena pesada y ligera humana expresada se amplifica después por PCR y se clona (Larrick *et al.*, *Biol. Technology*, 7: 934-938 (1989)). Después de que se haya determinado la secuencia de nucleótidos de estos clones, se sintetizan oligonucleótidos que codifiquen los mismos polipéptidos y se generan 55 vectores de expresión sintéticos como se describe por Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5454-5458 (1989).

Inmunización de Animales Transgénicos con Antígenos Complejos

60 El siguiente experimento demuestra que los animales transgénicos pueden inmunizarse con éxito con antígenos complejos tales como los de eritrocitos humanos y responder con cinéticas que son similares a las cinéticas de respuesta observadas en ratones normales.

65 Las células sanguíneas son generalmente inmunógenos adecuados y comprenden muchos tipos diferentes de antígenos en la superficie de eritrocitos y leucocitos.

ES 2 345 580 T3

Inmunización con sangre humana

Se recogieron tubos de sangre humana de un solo donante y se usaron para inmunizar ratones transgénicos que tenían loci de cadena pesada endógenos funcionalmente interrumpidos (J_HD) y que albergaban una construcción de minigén de cadena pesada humana (HCI); estos ratones se denominaron línea 112. Se lavó la sangre y se resuspendió en 50 ml de Hanks y se diluyó a 1×10^8 células/ml. Después se inyectaron 0,2 ml (2×10^7 células) por vía intraperitoneal usando una aguja de calibre 28 y una jeringa de 1 cc. Este protocolo de inmunización se repitió aproximadamente semanalmente durante 6 semanas. Se controlaron los títulos del suero extrayendo sangre de extracciones retroorbitarias y recogiendo el suero y, posteriormente, ensayándolo para determinar anticuerpos específicos. También se tomó una muestra de sangre preinmunización como control. En la última inmunización, tres días antes de que se sacrificaran estos animales para extraer el suero y generar los hibridomas, se administró por vía intravenosa una sola inmunización de 1×10^7 células a través de la cola para aumentar la producción de hibridomas.

TABLA 9

Animales					
	ID de Ratón	Línea	Sexo	HCI-112	JHD
1	2343	112	M	+	++
2	2344	112	M	-	+
3	2345	112	F	-	+
4	2346	112	F	-	++
5	2347	112	F	-	++
6	2348	112	F	+	++
7	2349	112	F	-	+

Los ratones N° 2343 y 2348 tenían un fenotipo deseado: transgénico de minigén de cadena pesada humana sobre fondo *knock-out* de cadena pesada.

Generación de Hibridomas

Se generaron hibridomas por fusión de esplenocitos de ratón de ratones transgénicos de aproximadamente 16 semanas de edad (Tabla 9) que se habían inmunizado como se ha descrito (anteriormente) con un compañero de fusión que consistía en la línea celular de mieloma sensible a HAT no secretora X63 Ag8.653. Se cultivaron clones de hibridoma y se identificaron los sobrenadantes de hibridoma que contenían inmunoglobulinas que tenían una afinidad de unión específica por antígenos de células sanguíneas, por ejemplo, por citometría de flujo.

Citometría flujo

Se ensayaron sobrenadantes de suero e hibridoma usando citometría de flujo. Se lavaron eritrocitos del donante 4X en solución salina equilibrada de Hanks y se pusieron 50.000 células en microtubos de polipropileno de 1,1 ml. Las células se incubaron con antisueros o sobrenadante de los hibridomas durante 30 minutos en hielo en medio de tinción (medio RPMI 1640 1x sin rojo fenol o biotina (Irvine Scientific), suero de ternera recién nacida al 3%, azida sódica al 0,1%). Los controles consistían en ratones hermanos de camada con otros genotipos. Después, las células se lavaron por centrifugación a 4°C en Sorvall RT600B durante 5-10 minutos a 1000 rpm. Las células se lavaron dos veces y después se detectó el anticuerpo en la superficie celular con un reactivo que desarrolla fluorescencia. Se usaron dos reactivos monoclonales para el ensayo. Uno era un anticuerpo de ratón anti-cadena pesada μ humana marcado con FITC (Pharmagen, San Diego, CA) y el otro era un anticuerpo de rata anti-cadena ligera kappa de ratón marcado con PE (Becton-Dickenson, San José, CA). Ambos reactivos dieron resultados similares. Se usó sangre completa (eritrocitos y leucocitos) y leucocitos en solitario como células diana. Ambos conjuntos dieron resultados positivos.

Se incubó suero de ratones transgénicos y controles hermanos de camada con eritrocitos del donante o leucocitos de otro individuo, se lavaron y después se revelaron con anticuerpo anti-IgM humana marcado con FITC y se analizaron en un citómetro de flujo. Los resultados mostraban que el suero de ratones que son transgénicos para el locus de minigén humano (ratones 2343 y 2348) muestra reactividad con IgM humana mientras que todos los animales hermanos de camada (2344, 2345, 2346, 2347) no la muestran. Se usó suero de ratón normal (NS) y solución salina tamponada con fosfato (PBS) como controles negativos. Los eritrocitos no se seleccionaron y los leucocitos se seleccionaron para incluir solamente linfocitos. Se dibujan líneas en el eje x e y para proporcionar una referencia. La citometría de flujo se realizó en 100 sobrenadantes de la fusión 2348. Cuatro sobrenadantes mostraban reactividad positiva para antígenos de células sanguíneas.

ES 2 345 580 T3

Ejemplo 18

Reducción de la Expresión de Inmunoglobulina de Ratón Endógena mediante ARN Antisentido

5 A. Vector para la Expresión de Secuencias de Ig Antisentido

1. Construcción del vector de clonación pGPIh

El vector pGPIb (al que se ha hecho referencia en un ejemplo anterior) se digiere con XhoI y BamHI y se liga con los oligonucleótidos siguientes:

5'- gat cct cga gac cag gta cca gat ctt gtg aat tcg -3' (SEC ID N°: 154)

15 5'- tcg acg aat tca caa gat ctg gta cct ggt ctc gag -3' (SEC ID N°: 155)

para generar el plásmido pGPIh. Este plásmido contiene un polienlazador que incluye los sitios de restricción siguientes: NotI, EcoRI, BglII, Asp718, XhoI, BamHI, HindIII, NotI.

20 Construcción de pBCE1

Un fragmento XbaI/BglII de 0,8 kb de pVH251 (al que se ha hecho referencia en un ejemplo anterior), que incluye el exón de secuencia líder de promotor, primer intrón y parte del segundo exón del segmento génico variable de inmunoglobulina de la familia VH-V humana, se insertó en vector pNN03 digerido con XbaI/BglII para generar el plásmido pVH251.

El fragmento de ADN BamHI/EcoRI de 2,2 kb que incluye los exones codificantes del gen de la hormona de crecimiento humana (hGH; Seeburg, (1982) DNA 1: 239-249) se clona en pGHIh digerido con BglII/EcoRI. El plásmido resultante se digiere con BamHI y el BamHI/BglII de pVH251N se inserta en la misma orientación que el gen hGH para generar el plásmido pVhgh.

Un fragmento XbaI de 0,9 kb de ADN genómico de ratón que contiene el potenciador intrónico J- μ de cadena pesada de ratón (Banerji *et al.*, (1983) Cell 33: 729-740) se subclonó en pUC18 para generar el plásmido pJH22.1. Este plásmido se linealizó con SphI y los extremos se rellenaron con la enzima klenow. El ADN tratado con klenow se digirió después con HindIII y un fragmento MluI(klenow)/HindIII de 1,4 kb del clon de fago λ 1.3 (ejemplo anterior), que contiene el potenciador intrónico J- μ de cadena pesada humana (Hayday *et al.*, (1984) Nature 307: 334-340), con él. El plásmido resultante, pMHE1, consiste en los potenciadores intrónicos J- μ de cadena pesada humana y de ratón ligados entre sí en pUC18 de modo que pueden escindirse en un solo fragmento BamHI/HindIII.

40 El fragmento BamHI/HindIII de pMHE1 se clona en pVhgh cortado con BamHI/HindIII para generar el vector de expresión de células B pBCE1. Este vector, representado en la Figura 36, contiene sitios de clonación XhoI y Asp718 únicos en los que pueden clonarse fragmentos de ADN antisentido. La expresión de estas secuencias antisentido está dirigida por la combinación de promotor/potenciador de cadena pesada arriba, las secuencias génicas de hGH cadena abajo proporcionan secuencias de poliadenilación además de secuencias intrónicas que promueven la expresión de construcciones transgénicas. Las construcciones transgénicas antisentido generadas a partir de pBCE1 pueden separarse de las secuencias de vector por digestión con NotI.

B. Una construcción transgénica antisentido de IgM.

50 Los dos oligonucleótidos siguientes:

5'- cgc ggt acc gag agt cag tcc ttc cca aat gtc - 3' (SEC ID N°: 156)

55 5'- cgc ctc gag aca gct gga atg ggc aca tgc aga -3' (SEC ID N°: 157)

se usaron como cebadores para la amplificación de secuencias de la región constante de IgM de ratón mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando ADNc de bazo de ratón como sustrato. El producto de PCR de 0,3 kb resultante se digirió con Asp718 y XhoI y se clonó en pBCE1 digerido con Asp718/XhoI para generar la construcción transgénica antisentido pMAS1. El inserto NotI purificado de pMAS1 se microinyectó en los pronúcleos de embriones de ratón de medio día en solitario o en combinación con una o más de otras construcciones transgénicas - para generar ratones transgénicos. Esta construcción expresa un transcrito de ARN en células B que hibrida con ARNm de IgM de ratón, regulando negativamente de este modo la expresión de proteína IgM de ratón. Los ratones dobles transgénicos que contienen pMAS1 y un minilocus de transgén de cadena pesada humana tal como pHCl (generado por coinyección de ambas construcciones o por cruce de ratones simples transgénicos) expresarán el receptor de Ig codificado por transgén humano en un mayor porcentaje de células B que los ratones transgénicos para el minilocus de cadena pesada humana solamente. La proporción de células que expresan receptor de Ig humano respecto a de ratón

se debe en parte a la competición entre las dos poblaciones por factores y células que promueven la diferenciación y expansión de células B. Debido a que el receptor de Ig desempeña un papel clave en el desarrollo de células B, las células B de expresión de receptor de Ig de ratón que expresen niveles reducidos de IgM en su superficie (debido a regulación negativa antisentido específica de Ig de ratón) durante el desarrollo de células B no competirán tan bien como las células que expresen el receptor humano.

C. Una construcción transgénica antisentido de IgKappa.

Los dos oligonucleótidos siguientes:

5'- cgc ggt acc gct gat gct gca cca act gta tcc -3' (SEC ID N°: 158)

5' - cgc ctc gag cta aca ctc att cct gtt gaa gct -3' (SEC ID N°: 159)

se usan como cebadores para la amplificación de secuencias de la región constante de IgKappa de ratón por reacción en cadena a la polimerasa (PCR) usando ADNc de bazo de ratón como sustrato. El producto de PCR de 0,3 kb resultante se digiere con Asp718 y XhoI y se clona en pBCE1 digerido con Asp718/XhoI para generar la construcción transgénica antisentido pKAS1. El inserto NotI purificado de pKAS1 se microinyecta en los pronúcleos de embriones de ratón de medio día en solitario o en combinación con una o más de otras construcciones transgénicas -para generar ratones transgénicos. Esta construcción expresa un transcrito de ARN en células B que hibrida con ARNm de IgK de ratón, regulando negativamente de este modo la expresión de proteína IgK de ratón como se ha descrito anteriormente para pMAS1.

Ejemplo 19

Este ejemplo demuestra la inmunización con éxito y la respuesta inmune en un ratón transgénico de la presente invención.

30 Inmunización de Ratones

Hemocianina de lapa californiana conjugada con más de 400 grupos dinitrofenilo por molécula (Calbiochem, La Jolla, California) (KLH-DNP) se precipitó con alumbre de acuerdo con un método publicado anteriormente (Practical Immunology, L. Hudson y F. C. Hay, Blackwell Scientific (Pubs.), pág. 9, 1980). Cuatrocientos μg de KLH-DNP precipitada con alumbre junto con 100 μg de bromuro de dimetildioctadecilamonio en 100 μl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) se inyectaron por vía intraperitoneal en cada ratón. Se recogieron muestras de suero seis días después por extracción de sangre del seno retroorbitario.

40 Análisis de Reactividad de Anticuerpos Humanos en Suero

Se evaluó la reactividad y especificidad de anticuerpos usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas indirecto (ELISA). Se ensayaron varios antígenos diana para analizar la inducción de anticuerpos por el inmunógeno. Se usó hemocianina de lapa californiana (Calbiochem) para identificar la reactividad contra el componente proteico, albúmina de suero bovino-DNP para la reactividad contra el hapteno y/o grupos amino modificados y KLH-DNP para reactividad contra el inmunógeno total. Se detectó la unión de anticuerpo humano a antígeno por conjugados de enzimas específicos para las subclases IgM e IgG sin reactividad cruzada con inmunoglobulina de ratón. En resumen, se recubrieron placas de microtitulación de PVC con antígeno secándolas durante una noche a 37°C de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína en PBS. Las muestras de suero diluidas en PBS, suero de pollo al 5%, Tween-20 al 0,5% se incubaron en los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de anti-F(ab') de IgG y Fc de IgG humana-peroxidasa de rábano picante o anti-Fc de IgM humana-peroxidasa de rábano picante en el mismo diluyente. Después de 1 hora a temperatura ambiente se evaluó la actividad enzimática por adición de sustrato ABTS (Sigma, St. Louis, Missouri) y se leyó después de 30 minutos a 415-490 nm.

55 Participación de la Cadena Pesada Humana en la Respuesta Inmune en Ratones Transgénicos

Las Figuras 37A-37D ilustran la respuesta de tres hermanos de camada de ratón a la inmunización con KLH-DNP. El ratón número 1296 llevaba el transgén no reorganizado de IgM e IgG humana y era homocigoto para la anulación de la cadena pesada de Ig de ratón. El ratón número 1299 llevaba el transgén en un fondo no *knockout*, mientras que el ratón 1301 no heredó ninguno de estos conjuntos de genes. El ratón 1297, otro hermano de camada, llevaba el transgén humano y era hemocigoto con respecto a la anulación de la cadena pesada de ratón. Se incluía como control no inmunizado.

Los resultados demuestran que se desarrollaron respuestas tanto de IgG como de IgM humana contra el hapteno en el contexto de la conjugación con proteína. También se desarrolló IgM humana contra la molécula de KLH pero no estaban presentes niveles significativos de IgG humana en este punto temporal. En las muestras de suero preinmunización de los mismos ratones, los títulos de anticuerpos humanos contra los mismos antígenos diana eran insignificantes.

ES 2 345 580 T3

Ejemplo 20

Este ejemplo demuestra la inmunización con éxito con un antígeno humano y la respuesta inmune en un ratón transgénico de la presente invención y proporciona datos que demuestran que se producen mutaciones somáticas no aleatorias en las secuencias de la región variable del transgén humano.

Demostración de respuestas de anticuerpos que comprenden cadenas pesadas de inmunoglobulina humana contra un antígeno de glicoproteína humana

Los ratones transgénicos usados para el experimento eran homocigotos para loci de cadena pesada de inmunoglobulina murina funcionalmente interrumpidos producidos por la introducción de un transgén en la región de unión (J) (anteriormente), dando como resultado la ausencia de producción de cadena pesada endógena (murina) funcional. Los ratones transgénicos también albergaban al menos un transgén de minilocus de cadena pesada humana no reorganizado completo (HCl, anteriormente), que incluía un solo gen V_H funcional (V_H251), gen de región constante μ humana y gen de región constante $\gamma 1$ humana. Los ratones transgénicos que se demostró que expresaban productos transgénicos de inmunoglobulina humana (anteriormente) se seleccionaron para la inmunización con un antígeno humano para demostrar la capacidad de los ratones transgénicos para generar una respuesta inmune contra una inmunización con antígeno humano. A tres ratones de la línea HC1-26 y tres ratones de la línea HC1-57 (anteriormente) se les inyectó antígeno humano.

Cien μg de antígeno carcinoembrionario humano purificado (CEA) insolubilizado en alumbre se inyectaron en adyuvante completo de Freund el Día 0, seguido de inyecciones semanales adicionales de CEA precipitado con alumbre en adyuvante incompleto de Freund los Días 7, 14, 21 y 28. Se recogieron muestras de suero por extracción de sangre retroorbitaria cada día antes de la inyección de CEA. Se combinaron volúmenes equivalentes de suero de cada uno de los tres ratones en cada grupo para su análisis. Se determinaron los títulos de inmunoglobulina que contiene cadena μ humana e inmunoglobulina que contiene cadena γ humana que se unían a CEA humano inmovilizado en pocillos de microtitulación mediante ensayo ELISA. Los resultados de los ensayos ELISA para inmunoglobulinas que contienen cadena μ humana e inmunoglobulinas que contienen cadena γ humana se muestran en las Figuras 38 y 39, respectivamente. Se detectaron títulos de Ig de cadena μ humana significativos para ambas líneas el Día 7 y se observó que aumentaban todavía hasta aproximadamente el Día 21. Para la Ig de cadena γ humana, los títulos significativos se retrasaron, siendo evidentes primero para la línea HC1-57 el Día 14 y posteriormente para la línea HC1-26 el Día 21. Los títulos para Ig de cadena γ humana continuaron mostrando un aumento con el tiempo durante el transcurso del experimento. La respuesta de Ig de cadena μ humana observada, seguida de una meseta, combinada con una respuesta de cadena γ que se desarrolla más tarde que continúa aumentando, es característica del patrón observado con la maduración por afinidad. El análisis de muestras del Día 21 mostraba una ausencia de reactividad con un antígeno no relacionado, hemocianina de lapa californiana (KLC), indicando que la respuesta de anticuerpo se dirigía contra CEA de una forma específica.

Estos datos indican que los animales transgénicos para loci de genes de inmunoglobulina no reorganizados humanos: (1) pueden responder a un antígeno humano (por ejemplo, la glicoproteína humana CEA), (2) pueden experimentar un cambio de isotipo ("cambio de clase") como se ejemplifica por el cambio de clase μ a γ observado y (3) presentan características de maduración por afinidad en sus respuestas inmunes humorales. En general, estos datos indican: (1) los ratones transgénicos de Ig humana tienen la capacidad de inducir la producción de anticuerpos heterólogos en respuesta a un antígeno definido, (2) la capacidad de una sola región variable de cadena pesada de transgén para responder a un antígeno definido, (3) las cinéticas de respuesta durante un periodo de tiempo típico de desarrollo de respuesta primaria y secundaria, (4) el cambio de clase de una respuesta inmune humoral codificada por transgén de IgM a IgG y (5) la capacidad de un animal transgénico para producir anticuerpos de secuencia humana contra un antígeno humano.

Demostración de mutación somática en un minilocus de transgén de cadena pesada humana,

Ratones transgénicos de la línea HC1-57, que contienen múltiples copias del transgén HCl, se cruzaron con ratones con delección de cadena pesada de inmunoglobulina para obtener ratones que contienen el transgén HCl y contienen interrupciones en ambos alelos de la cadena pesada de ratón endógena (anteriormente). Estos ratones expresan cadenas pesadas μ y $\gamma 1$ humanas junto con cadenas ligeras κ y λ de ratón (anteriormente). Uno de estos ratones se hiperinmunizó contra antígeno carcinoembrionario humano mediante inyecciones intraperitoneales repetidas a lo largo del transcurso de 1,5 meses. Este ratón se sacrificó y se aislaron células linfáticas del bazo, ganglios linfáticos inguinal y mesentérico y placas de peyer. Las células se combinaron y se aisló el ARN total. Se sintetizó ADNc de primera cadena a partir del ARN y se usó como molde para la amplificación por PCR con los 2 cebadores oligonucleotídicos siguientes:

149 5'-cta gct cga gtc caa gga gtc tgt gcc gag gtg cag ctg (g/a/t/c)-3' (SEC ID

Nº:82)

151 5'-ggc gct cga gtt cca cga cac cgt cac cgg ttc-3' (SEC ID Nº:84)

ES 2 345 580 T3

Estos cebadores amplifican específicamente secuencias de ADNc VH251/gammaI. Las secuencias amplificadas se digirieron con XhoI y se clonaron en el vector pNN03. La secuencia de ADN de los insertos de 23 clones aleatorios se muestra en la Figura 40; se indican variaciones de secuencia de la secuencia de línea germinal, los puntos indican que la secuencia es idéntica a la línea germinal. La comparación de las secuencias de ADNc con la secuencia de línea germinal del transgén VH251 pone de manifiesto que 3 de los clones están totalmente sin mutar mientras que los otros 20 clones contienen mutaciones somáticas. Una de las 3 secuencias no mutadas procede de una unión VDJ fuera de fase de lectura. Las mutaciones somáticas observadas en posiciones específicas aparecen a frecuencias similares y en patrones de distribución similares a los observados en linfocitos humanos (Cai *et al.* (1992) *J. Exp. Med.* 176: 1073, incorporada en la presente memoria como referencia). La frecuencia global de las mutaciones somáticas es de aproximadamente el 1%; sin embargo, la frecuencia sube hasta aproximadamente el 5% dentro de CDR1, indicando selección a favor de cambios de aminoácidos que afecten a la unión a antígeno. Esto demuestra maduración por afinidad dirigida por antígeno de las secuencias de cadena pesada humana.

15 Ejemplo 21

Este ejemplo demuestra la formación con éxito de un transgén por cointroducción de dos polinucleótidos separados que se recombinan para formar un transgén de minilocus de cadena ligera humana completo.

20 *Generación de un transgén de minilocus de cadena ligera no reorganizado por coinyección de dos fragmentos de ADN solapantes*

25 1. Aislamiento de los segmentos génicos de V_{κ} funcionales no reorganizados vk65.3, vk65.5, vk65.8 y vk65.15

El oligonucleótido específico de V_{κ} , el oligo-65 (5'-agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc-3'; SEC ID N°: 153), se usó para sondar una biblioteca de ADN genómico placentario humano clonada en el vector de fago λ EMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA). Los fragmentos de ADN que contienen segmentos V_{κ} de clones de fago positivos se subclonaron en vectores plasmídicos. Los segmentos génicos variables de los clones resultantes se secuencian y los clones que parecen funcionales se seleccionan. Los criterios para juzgar la funcionalidad incluyen: fases de lectura abierta, secuencias donadora y aceptora de corte y empalme intactas y secuencia de recombinación intacta. Se muestran secuencias de ADN de 4 segmentos génicos de V_{κ} funcionales (vk65.3, vk65.5, vk65.8 y vk65.15) de 4 clones de plásmido diferentes aislados mediante este procedimiento en las Figuras 41-44. Los cuatro clones de plásmido p65.3f, p65.5gl, p65.8 y p65.15f, se describen a continuación.

(1 a) p65.3f

40 Un fragmento XbaI de 3 kb del clon de fago λ 65.3 se subclonó en pUC19 de modo que el sitio SalI derivado de vector estaba proximal al extremo 3' del inserto y el sitio BamHI derivado del vector 5'. El inserto BamHI/SalI de 3 kb de este clon se subclonó en pGP1f para generar p65.3f.

45 (1 b) p65.5gl

Se subclonó un fragmento EcoRI de 6,8 kb del con de fago λ 65.5 en pGP1f de modo que el sitio XhoI derivado del vector está proximal al extremo 5' del inserto y el sitio SalI derivado del vector 3'. El plásmido resultante se denomina p65.5gl.

50

(1 c) p65.8

55 Un fragmento HindIII de 6,5 kb del clon de fago λ 65.5 se clonó en pSP72 para generar p65.8.

(1 d) p65.15f

60 El segmento génico de V_{κ} dentro del inserto del plásmido se mapeó en un subfragmento EcoRI/HindIII de 4,6 kb, que se clonó en pGP1f. El clon resultante, p65.15f, tiene sitios XhoI y SalI únicos localizados en los extremos 5' y 3' respectivos del inserto.

65 2. pKV4

El inserto XhoI/SalI de p65.8 se clonó en el sitio XhoI de p65.15f para generar el plásmido pKV2. El inserto XhoI/SalI de p65.5gl se clonó en el sitio XhoI de pKV2 para generar pKV3. El inserto XhoI/SalI de pKV3 se clonó

ES 2 345 580 T3

en el sitio XhoI de p65.3f para generar el plásmido pKV4. Este plásmido contiene un solo inserto XhoI/SalI de 21 kb que incluye 4 segmentos génicos de V_k funcionales. El inserto completo también puede escindirse con NotI.

3. pKC1B

(3 a) pKcor

Dos fragmentos XhoI derivados de clones de fago X de ADN genómico humano se subclonaron en vectores plasmídicos. El primero, un fragmento que contenía J_{k2} - J_{k5}/C_k de 13 kb se trató con enzima Klenow y se clonó en plásmido pGP1d tratado con Klenow digerido con HindIII. Un clon de plásmido (pK-31) se seleccionó de modo que el extremo 5' del inserto sea adyacente al sitio ClaI derivado del vector. El segundo fragmento XhoI, un fragmento de ADN de 7,4 kb que contiene J_{k1} , se clonó en pSP72 digerido con XhoI/SalI de modo que el sitio XhoI del inserto 3' se destruía por ligación con el sitio SalI del vector. El clon resultante, p36.2s, incluye un sitio ClaI derivado del inserto 4,5 kb cadena arriba de J_{k1} y un sitio ClaI derivado del polienlazador cadena abajo en lugar del sitio XhoI de origen natural entre J_{k1} y J_{k2} . Este clon se digirió con ClaI para liberar un fragmento de 4,7 kb que se clonó en pK-31 digerido con ClaI en la orientación 5' a 3' correcta para generar un plásmido que contiene los 5 segmentos J_k humanos, el potenciador intrónico humano, C_k humana, 4,5 kb de secuencia flanqueante 5' y 9 kb de secuencia flanqueante 3'. Este plásmido, pKor, incluye sitios XhoI y SalI flanqueantes únicos en los lados 5' y 3' respectivos del inserto.

(3 b) pKcorB

Un fragmento BamHI de 4 kb que contiene el potenciador kappa 3' humano (Jude, J. -G. y Max, E. E. (1992) Mol. Cell. Biol. 12: 5206, incorporado en la presente memoria como referencia) se clonó en pGP1f de modo que el extremo 5' esté proximal al sitio XhoI del vector. El plásmido resultante, p24Bf, se cortó con XhoI y el fragmento XhoI/SalI de 17,7 kb de pKcor se clonó en el mismo en la misma orientación que el fragmento potenciador. El plásmido resultante, pKcorB, incluye sitios XhoI y SalI únicos en los extremos 5' y 3' del inserto, respectivamente.

(3 c) pKC1B

El inserto XhoI/SalI de pKcorB se clonó en el sitio SalI de p65.3f para generar el plásmido transgénico de minilocus de cadena ligera pKC1B. Este plásmido incluye un solo segmento V_k humano funcional, los 5 segmentos J_k humanos, el potenciador intrónico humano, C_k humano y el potenciador kappa 3' humano. El inserto de 25 kb completo puede aislarse mediante digestión con NotI.

4. Co4

Los dos insertos NotI de los plásmidos pKV4 y pKC1B se mezclaron a una concentración de 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cada uno en tampón de microinyección y se coinyectaron en los pronúcleos de embriones de ratón de medio día como se ha descrito en los ejemplos anteriores. Los animales transgénicos resultantes contienen insertos transgénicos (denominados Co4, producto de la recombinación mostrada en la Figura 45) en los que los dos fragmentos se cointegran. Las 3 kb 3' del inserto de pKV4 y las 3 kb 5' del inserto de pKC1B son idénticas. Algunos de los acontecimientos de integración representarán recombinaciones homólogas entre los dos fragmentos a lo largo de las 3 kb de secuencia compartida. El locus Co4 dirigirá la expresión de un repertorio de cadenas ligeras de secuencia humana en un ratón transgénico.

Ejemplo 22

Este ejemplo demuestra la producción con éxito de un clon de hibridoma murino que secreta un anticuerpo monoclonal reactivo con un inmunógeno específico, en el que el anticuerpo monoclonal comprende una cadena de inmunoglobulina humana codificada por un transgén de Ig humana.

Generación de Anticuerpos Monoclonales que Incorporan un Producto Transgénico de Cadena Pesada Humana

1. Inmunización de Ratonos que Albergan Transgenes de Cadena Pesada Humana

Un ratón que contiene un transgén codificante de cadena pesada humana y homocigoto para la anulación (es decir, interrupción funcional) del locus de cadena pesada endógeno (véase, el EJEMPLO 20 anterior) se inmunizó con CEA humano purificado y posteriormente se recogieron las células de bazo después de un periodo de respuesta inmune adecuado. Las células de bazo murinas se fusionaron con células de mieloma de ratón para generar hibridomas usando técnicas convencionales (véase, Kohlerand y Milstein, Eur. J. Immunol., 6: 511-519 (1976); Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York (1988)). El ratón usado para la inmunización contenía un transgén de minilocus de cadena pesada no reorganizada humana que comprendía un solo gen V_H funcional (V_{H251}), segmentos D y J humanos, región constante μ humana y genes de la región constante $\gamma 1$ humana. La línea transgénica de la que procedía se denominó HC1-57 (anteriormente).

Cien μg de antígeno carcinoembrionario humano purificado (CEA) (Cyrstal Chem, Chicago, IL o Scripps Labs, San Diego, CA) insolubilizados en alumbre se inyectaron en adyuvante completo de Freund el Día 0, seguido de inyecciones semanales adicionales de CEA precipitado con alumbre en adyuvante incompleto de Freund los Días

ES 2 345 580 T3

7, 14, 21 y 28. Se administraron 20 μg adicionales de CEA soluble por vía intravenosa el Día 83, seguidos de 50 μg de CEA precipitado con alumbre en adyuvante incompleto de Freund el Día 92. Se confirmaron respuestas de cadena pesada humana contra CEA en muestras de suero antes de la fusión de esplenocitos con células de mieloma. El animal se sacrificó el Día 95, se extirpó el bazo y se fusionó con células de mieloma de ratón P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580, Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD) usando polietilenglicol. Dos semanas después se exploraron los sobrenadantes de pocillos de fusión para determinar la presencia de anticuerpos específicamente reactivos con CEA, y que contenían epítomos de región constante μ o μ de cadena pesada humana mediante ELISA. En resumen, se recubrió CEA humano purificado sobre placas de microtitulación de PVC a 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se incubó con sobrenadante de cultivo diluido 1:4 ó 1:5 en PBS, Tween-20 al 0,5%, suero de pollo al 5%. Las placas se lavaron, seguido de adición de antisuero de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante específico para Fc de IgG humana o antisuero de conejo específico para Fc5Mu de IgM humana (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Se determinó la presencia de conjugado unido a anticuerpo capturado después de un lavado adicional por adición de sustrato ABTS. Se descubrió que dos pocillos de fusión independientes contenían anticuerpo con una unión sustancial a CEA. Después de la clonación, se descubrió que ambos hibridomas eran positivos para la presencia de cadena μ humana y cadena κ murina por ELISA. No se detectaron IgG o IgM de ratón usando ensayos similares.

La subclonación de los dos hibridomas parentales independientes dio como resultado dos clones denominados 92-09A-4F7-A5-2 y 92-09A-1D7-1-7-1. Ambas líneas se depositaron en el Depósito de Cultivos de Patentes de la ATCC de acuerdo con el Tratado de Budapest y se les asignó la Designación de la ATCC HB 11307 y HB 11308, respectivamente. Se evaluaron sobrenadantes de cultivo de estas líneas celulares para determinar su especificidad por ensayo de la reactividad contra varias proteínas diana purificadas usando ELISA. Como se muestra en la Figura 46, los ensayos ELISA para determinar la reactividad de los anticuerpos monoclonales contra diversos antígenos demuestran que sólo el CEA y el antígeno relacionado con CEA NCA-2 muestran una reactividad significativa, indicando el desarrollo de una reactividad restringida para las regiones variables de las moléculas de inmunoglobulina heterohíbridas.

Ejemplo 23

Este ejemplo demuestra que un gen de VDJ humano reorganizado codificado por un transgén de minilocus de Ig humana puede transcribirse como un transcrito que incluye un gen de región constante de Ig endógeno, por ejemplo, mediante el mecanismo de cambio en trans, para codificar una cadena de Ig humana/de ratón quimérica.

Identificación de Transcritos con Cambio en Trans que Codifican Cadenas Pesadas Humanas-de Ratón Quiméricas

Se aisló ARN a partir de un ratón transgénico HCI línea 57 hiperinmunizado homocigoto para la delección del segmento J de la cadena pesada endógena (anteriormente). Se sintetizó ADNc de acuerdo con Taylor *et al.* (1993) Nucleic Acids Res. 20: 6287, incorporado en la presente memoria como referencia, y se amplificó por PCR usando los dos cebadores siguientes:

o-149 (V_{H251} humana):

5'-CTA GCT CGA GTC CAA GGA GTC TGT GCC GAG GTG CAG CTG

(G,A,T,C)-3' (SEC ID N°: 82)

o-249 (gamma de ratón):

5'-GGC GCT CGA GCT GGA CAG GG(A/C) TCC A(G/T)A GTT CCA-3' (SEC

ID N°: 160)

El oligonucleótido o-149 se especificó para el segmento génico variable codificado por HCI V_{H251} , mientras que o-249 hibrida con secuencias gamma tanto humanas como de ratón con el orden de especificidades siguiente:

$\gamma 1$ de ratón = $\gamma 2b$ de ratón = $\gamma 3$ de ratón > $\gamma 2a$ de ratón >> $\gamma 1$ humana. Se determinaron las secuencias de ADN de 10 clones seleccionados aleatoriamente generados a partir de los productos de PCR y se muestran en la Figura 47. Dos clones comprendían VDJ humana y $\gamma 1$ de ratón; cuatro clones comprendían VDJ humana y $\gamma 2b$ de ratón; y cuatro clones comprendían VDJ humana y $\gamma 3$ de ratón. Estos resultados indican que en una fracción de las células B transgénicas, la VDJ humana codificada por transgén se recombinaba en el locus de cadena pesada murina endógeno por cambio de clase o una recombinación análoga.

Ejemplo 24

Este ejemplo describe un método para explorar una combinación de hibridomas para discriminar clones que codifiquen cadenas de Ig humana/de ratón quiméricas a partir de clones que codifiquen y expresen una cadena de Ig humana. Por ejemplo, en una combinación de clones de hibridoma generada a partir de un ratón transgénico que com-

ES 2 345 580 T3

prende un transgén de cadena pesada de Ig humana y homocigoto para un locus de cadena pesada endógeno de región J interrumpida, pueden identificarse clones de hibridoma que codifiquen cadenas pesadas de región constante murina-VDJ humana con cambio en trans y separarse de los clones de hibridoma que expresen cadenas pesadas de región constante humana-VDJ humana.

5

Exploración de Hibridomas para Eliminar Cadenas de Ig Quiméricas

El proceso de exploración implica dos fases, que pueden realizarse individualmente u opcionalmente en combinación: (1) una exploración basada en ELISA preliminar y (2) una caracterización molecular secundaria de hibridomas candidato. Preferiblemente, se usa una exploración basada en ELISA preliminar para la identificación inicial de hibridomas candidato que expresen una región VDJ humana y una región constante humana.

10

Los hibridomas que muestran reactividad positiva con el antígeno (por ejemplo, el inmunógeno usado para generar la respuesta de anticuerpo en el ratón transgénico) se ensayan usando un panel de anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con μ , γ , κ y X de ratón y μ , γ y κ humana. Sólo los hibridomas que son positivos para cadenas ligera y pesada humanas, así como negativos para cadenas de ratón, se identifican como hibridomas candidato que expresan cadenas de inmunoglobulina humana. Por lo tanto, se muestra que los hibridomas candidato tienen reactividad con un antígeno específico y poseen epítotos característicos de una región constante humana.

15

Se aísla el ARN de hibridomas candidato y se usa para sintetizar ADNc de primera cadena. El ADNc de primera cadena se liga después con un oligonucleótido monocatenario único de secuencia predeterminada (oligo-X) usando ARN ligasa (que liga ADN monocatenario). El ADNc ligado se amplifica después en dos reacciones mediante PCR usando dos conjuntos de cebadores oligonucleotídicos. El conjunto H (cadena pesada) incluye un oligonucleótido que hibrida específicamente con μ humana o γ 1 humana (dependiendo de los resultados del ELISA) y un oligonucleótido que hibrida con la secuencia del oligo-X. Esto evita una predisposición en contra de la detección de segmentos V particulares, incluyendo segmentos V de ratón, que puedan haberse reorganizado en trans en los minilocus humanos. Un segundo conjunto de cebadores, el conjunto L (cadena ligera), incluye un oligonucleótido que hibrida específicamente con κ humana y un oligonucleótido que hibrida específicamente con oligo-X. Los productos de PCR se clonan molecularmente y la secuencia de ADN de varios se determina para determinar si el hibridoma está produciendo un anticuerpo humano único basándose en la comparación de secuencia con secuencias de Ig murinas y humanas.

20

25

30

Ejemplo 25

Este ejemplo demuestra la producción de un ratón transgénico que alberga un minilocus de cadena ligera humana (κ)

35

Ratones transgénicos con minilocus κ humano

40

KC1

Un fragmento XhoI que contiene J κ 2-K κ de 13 kb de un clon de fago (aislado a partir de una biblioteca de fago de ADN genómico humano por hibridación con un oligonucleótido específico de κ , por ejemplo, anteriormente) se trató con enzima Klenow y se clonó en el sitio HindIII tratado con Klenow de pGP1d para producir pK-31. Esto destruía los sitios XhoI del inserto y situaba el sitio XhoI derivado del polienlazador único en el extremo 5' próximo a J κ 2. Un sitio ClaI derivado del polienlazador único se localiza entre este sitio XhoI y las secuencias del inserto, mientras que un sitio SalI derivado del polienlazador único se localiza en el extremo 3' del inserto. Un fragmento XhoI de 7,5 kb que contiene J κ 1 y secuencias cadena arriba se aisló también a partir de un clon de fago de ADN genómico humano (aislado a partir de una biblioteca de fago de ADN genómico humano por hibridación con un oligonucleótido específico de κ , por ejemplo, anteriormente). Este fragmento XhoI de 7,5 kb se clonó en el sitio SalI de pSP72 (Promega, Madison, Wisconsin), destruyendo de este modo ambos sitios XhoI y situando un sitio ClaI del polienlazador 3' de J κ 1. La digestión del clon resultante con ClaI liberaba un fragmento de 4,7 kb que contenía J κ 1 y 4,5 kb de secuencias cadena arriba. Este fragmento de 4,7 kb se clonó en el sitio ClaI de pK-31 para generar pKcor. El sitio XhoI 5' único restante procede de secuencias del polienlazador. Un fragmento de ADN XhoI/SalI de 6,5 kb que contiene el segmento génico de V κ III humano no reorganizado 65.8 (plásmido p65.8, EJEMPLO 21), se clonó en el sitio XhoI de pKcor para generar el plásmido pKC1. El inserto NotI de pKC1 se microinyectó en embriones de ratón de 1/2 día para generar ratones transgénicos. Se establecieron dos líneas transgénicas derivadas de pKC1 independientes y se usaron para cruzar ratones que contenían miniloci de cadena tanto pesada como ligera. Se estimó por hibridación de transferencia de Southern que estas líneas, KC1-673 y KC1-674, contenían integraciones de aproximadamente 1 y 10-20 copias de los transgenes, respectivamente.

45

50

55

60

KC1e

El plásmido pMHE1 (EJEMPLOS 13 y 18) se digirió con BamHI y HindIII para escindir el inserto de 2,3 kb que contienen los potenciadores intrónicos J- μ de cadena pesada tanto de ratón como humano. Este fragmento se trató con Klenow, se ligó con enlazadores SalI (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts), y se clonó en el sitio SalI 3' único de pKC1 para generar el plásmido pKC1e. El inserto NotI de pKC1e se microinyectó en embriones de ratón de 1/2 día para generar ratones transgénicos. Se establecieron cuatro líneas transgénicas derivadas de pKC1e

65

ES 2 345 580 T3

independientes y se usaron para cruzar ratones que contenían miniloci tanto de cadena ligera como pesada. Se estimó por hibridación de transferencia de Southern que estas líneas, KC1e-1399, KC1e-1403, KC1e-1527 y KC1e-1536, contenían integraciones de aproximadamente 20-50, 5-10, 1-5 y 3-5 copias del transgén, respectivamente.

5 pKC2

Un fragmento de ADN XhoI/SalI de 6,8 kb que contenía el segmento génico V κ III humano no reorganizado 65.5 (plásmido p65.5g1, EJEMPLO 21) se clonó en el sitio XhoI 5' único de pKC1 para generar el plásmido pKC2. Este transgén de minilocus contiene dos segmentos génicos V κ III funcionales diferentes. El inserto NotI de pKC2 se microinyectó en embriones de ratón de 1/2 día para generar ratones transgénicos. Se establecieron cinco líneas transgénicas derivadas de pKC2 independientes y se usaron para cruzar ratones que contenían miniloci tanto de cadena pesada como ligera. Se estimó por hibridación de transferencia de Southern que estas líneas, KC2-1573, KC2-1579, KC2-1588, KC2-1608 y KC2-1610, contenían integraciones de aproximadamente 1-5, 10-50, 1-5, 50-100 y 5-20 copias del transgén, respectivamente.

15

Ejemplo 26

Este ejemplo muestra que ratones transgénicos que llevan el transgén κ humano pueden generar una respuesta de anticuerpos inducida por antígeno de formación de anticuerpos que comprenden una cadena κ humana funcional.

20

Respuestas de Anticuerpos Asociadas con Cadena Ligera κ de Ig Humana

Un ratón transgénico que contiene los transgenes de cadena pesada humana HC1-57 y de κ humana KC1e se inmunizó con CD4 soluble humano purificado (un antígeno glicoproteico humano). Veinte μ g de CD4 humano purificado (NEN Research products, Westwood, MA) insolubilizados por conjugación con partículas de látex de poliestireno (Polysciences, Warrington, PA) se inyectaron por vía intraperitoneal en solución salina con bromuro de dimetildioctadecilamonio (Calbiochem, San Diego, CA) el Día 0, seguido de inyecciones adicionales el Día 20 y el Día 34.

25

Se realizaron extracciones de sangre retroorbitaria los Días 25 y 40 y se exploraron para determinar la presencia de anticuerpos contra CD4 que contienen cadena pesada de IgM humana o IgG humana mediante ELISA. En resumen, se recubrió CD4 humano purificado sobre placas de microtitulación de PVC a 2,5 μ g/ml y se incubaron con sobrenadante de cultivo diluido 1:4/1:5 en PBS, Tween-20 al 0,5%, suero de pollo al 5%. Las placas se lavaron, seguido de adición de antisuero de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante específico para Fc de Ig humana o antisuero de conejo específico para Fc5Mu de IgM humana (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Se determinó la presencia de conjugado unido a anticuerpo capturado después de un lavado adicional por adición de sustrato ABTS. Se detectó μ humana reactiva con antígeno en ambas extracciones de sangre, mientras que había una reactividad γ esencialmente indetectable. La muestra de Día 40 también se ensayó para cadena κ humana reactiva con antígeno usando el mismo ensayo con anticuerpo de cabra anti- κ humana conjugado con peroxidasa (Sigma, St. Louis, MO). Se detectó la reactividad de κ de unión a CD4 en este punto temporal. Los resultados de ensayo se muestran en la Figura 48.

30
35
40

Ejemplo 27

Este ejemplo muestra la generación con éxito de ratones que son homocigotos para loci de cadena ligera y pesada murinos funcionalmente interrumpidos (loci de cadena pesada y cadena κ) y que al mismo tiempo albergan un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana capaz de reorganizarse productivamente para codificar cadenas pesadas humanas funcionales y cadenas ligeras humanas funcionales. Dichos ratones se denominan ratones "0011", indicando mediante los dos 0 en los primeros dos dígitos que los ratones carecen de loci de cadena ligera y pesada funcionales e indicando mediante los 1 en los segundos dos dígitos que los ratones son hemocigotos para un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana. Este ejemplo muestra que dichos ratones 0011 son capaces de generar una respuesta de anticuerpos específica contra un antígeno predeterminado y que dicha respuesta de anticuerpos puede implicar un cambio de isotipo.

50

Ratones 0011/0012: Transgenes de Ig Humana + Knockout para Ig Endógena

Ratones que eran homocigotos para un locus de cadena pesada endógeno funcionalmente interrumpido que carecía de una región J_H funcional (denominados JHD++ o JH Δ ++) y que albergaban también el transgén HC1 humano, tal como la línea de ratón transgénico HC1-26 descrita anteriormente, se cruzaron con ratones homocigotos para un locus de cadena kappa endógena funcionalmente interrumpido que carecía de una región J_H funcional (denominados en la presente memoria JKD++ o JK Δ ++; véase el Ejemplo 9) para producir ratones homocigotos para loci de cadena kappa y cadena pesada funcionalmente interrumpidos (*knockout* para cadena pesada/cadena kappa), denominados JHD++/JKD++ y que contienen un transgén HC1. Dichos ratones se produjeron por cruce de diferentes líneas y se seleccionaron basándose en el genotipo según se evaluó por transferencia de Southern de ADN genómico. Estos ratones, denominados ratones HC1-26+/JKD++/JHD++, se cruzaron con ratones que albergaban un transgén de cadena kappa humana (líneas KC2-1610, KC1e-1399 y KC1e-1527; véase el Ejemplo 25) y se usó análisis de transferencia de Southern de ADN genómico para identificar ratones descendientes homocigotos para loci de cadena ligera y pesada funcionalmente interrumpidos y también hemocigotos para el transgén HC1 y el transgén KC2 o KC1e. Dichos ratones

65

ES 2 345 580 T3

se designan mediante números y se identificaron en relación con su genotipo, con las abreviaturas siguientes: HCI-26+ indica hemicigoto para la integración del transgén de minilocus de cadena pesada humana de línea HCI-26; JHD++ indica homocigoto para la anulación de J_H ; JKD++ indica homocigoto para la anulación de J_K ; KC2-1610+ indica hemicigoto para un transgén κ humano KC2 integrado como en la línea KC2-1610; KC1e-1527+ indica hemicigoto para un transgén κ humano KC1e integrado como en la línea KC1e-1527; KC1e-1399+ indica hemicigoto para un transgén κ humano KC1e integrado como en la línea KC1e-1399.

A cada descendencia individual resultante se le dio una designación numérica (por ejemplo, 6295, 6907, etc.) y cada uno se evaluó para determinar la presencia de alelos *knockout* para J_H , alelos *knockout* para J_K , transgén HCI-26 y transgén κ (KC2 o KC1e), y se determinó que eran hemicigotos (+) u homocigotos (++) en cada locus. La Tabla 10 muestra la designación numérica, el sexo y los genotipos de varios de los ratones descendientes.

TABLA 10

ID N°	Sexo	Código de Ig	Genotipo
6295	M	0011	HCI-26+;JHD++;JKD++;KC2-1610+
6907	M	0011	HCI-26+;JHD++;JKD++;KC1e-1527+
7086	F	0011	HCI 26+;JHD++;JKD++;XC1e-1399+
7088	F	0011	HCI-26+;JHD++;JKD++;KC1e-1399+
7397	F	0011	HCI-26+;JHD++;JKD++;KC1e-1527+
7494	F	0012	HCI-26+;JFiD++;JKD++;KC2-1610++
7497	M	0011	HCI-26+;JHD++;JKD++;KC1e-1399+
7648	F	0011	HCI-26+;JHD++;JKD++;KC2-1610+
7649	F	0012	HCI-26+;JHD++;JKD++;KC2-1610++
7654	F	0011	HCI-26+;JHD++;JKD++;KC2-1610+
7655	F	0011	HCI-26+;JHD++;JKD++;KC2-1610+
7839	F	0011	HCI-26+;JHD++;JKD++;KC1e-1399+
7656	F	0001	HCI-26-;JHD++;JKD++;KC2-1610+
7777	F	1100	Col-2141-;JHD+;JKD+

Se extirparon bazos de tres ratones hembra de 6 semanas de edad. Se determinó por hibridación de transferencia de Southern que el ratón N° 7655 era hemicigoto para las integraciones de transgén HCI (línea 26) y KC2 (línea 1610) y homocigoto para las delecciones dirigidas $J_H\Delta$ y $J_K\Delta$ de las regiones μ y κJ de ratón. Se determinó por hibridación de transferencia de Southern que el ratón N° 7656 era hemicigoto para la integración del transgén KC2 (línea 1610) y homocigoto para las delecciones dirigidas $J_H\Delta$ y J_KA de las regiones μ y κJ de ratón. Se determinó por hibridación de transferencia de Southern que el ratón N° 7777 era hemicigoto para las delecciones dirigidas $J_H\Delta$ y $J_K\Delta$ de las regiones μ y κJ de ratón. Debido a la naturaleza recesiva de estas delecciones, estos ratones deberían ser fenotípicamente de tipo silvestre.

Expresión de Cadenas de Ig Endógenas en Ratones 0011

Se usó análisis de FACS usando un panel de anticuerpos reactivos con μ humana, μ de ratón, κ humana, κ de ratón o X de ratón para separar linfocitos explantados de (1) un ratón de tipo silvestre (7777), (2) un ratón 0011 homocigoto para alelos *knockout* para kappa y cadena pesada y que alberga un transgén de cadena ligera humana (7656) y (3) un ratón 0011 homocigoto para alelos *knockout* para kappa y cadena ligera y que alberga un transgén de cadena ligera humana y un transgén de cadena pesada humana (7655).

Se prepararon suspensiones de una sola célula a partir de bazo y se lisaron los eritrocitos con NH_4Cl como se describe por Mishell y Shiigi (Mishell, B. B. y Shiigi, S. M. (eds) Selected Methods in Cellular Immunology. W. H. Freeman & Co., Nueva York, 1980).

Los linfocitos se tiñeron con los reactivos siguientes: yoduro de propidio (Molecular Probes, Eugene, OR), anti-IgM humana conjugado con FITC (clon G20-127; Pharmingen, San Diego, CA), anti-IgM de ratón conjugado con

ES 2 345 580 T3

FITC (clon R6-60.2; Pharmingen, San Diego, CA), anti-Ig κ humana conjugado con ficoeritrina (clon HP6062; CalTag, South San Francisco, CA), anti-Ig λ de ratón conjugado con FITC (clon R26-46; Pharmingen, San Diego, CA), anti-B220 de ratón conjugado con FITC (clon RA3-6B2; Pharmingen, San Diego, CA) y anti-B220 de ratón conjugada con Cy-Chrome (clon RA3-6B2; Pharmingen, San Diego, CA). Se analizaron las células teñidas usando un citómetro de flujo FACScan y el programa informático LYSIS II (Becton Dickinson, San José, CA). Se excluyeron macrófagos y eritrocitos residuales por selección en dispersión hacia delante y lateral. Se excluyeron las células muertas eliminando por selección las células positivas a yoduro de propidio. Los datos de citometría de flujo de las Figuras 49 y 50 confirman los datos de hibridación de transferencia de Southern y demuestran que el ratón N° 7655 expresa tanto μ humana como κ humana y relativamente poca, si expresa algo, μ de ratón o κ de ratón. No obstante, una fracción significativa de las células B (aproximadamente el 70-80%) parece expresar receptores de Ig híbridos que consisten en cadenas ligera X de ratón y pesada humana.

La Figura 49 muestra la distribución relativa de células B que expresan μ humana o μ de ratón en la superficie celular; los linfocitos de ratón 0011 (7655) son positivos para μ humana pero carecen relativamente de μ de ratón; los linfocitos de ratón 0001 (7656) no expresan mucha μ humana o μ de ratón; los linfocitos de ratón de tipo silvestre (7777) expresan μ de ratón pero carecen de μ humana.

La Figura 50 muestra la distribución relativa de células B que expresan κ humana o κ de ratón en la superficie celular; los linfocitos de ratón 0011 (7655) son positivos para κ humana pero carecen relativamente de κ de ratón; los linfocitos de ratón 0001 (7656) no expresan mucha κ humana o κ de ratón; los linfocitos de ratón de tipo silvestre (7777) expresan κ de ratón pero carecen de κ humana.

La Figura 51 muestra la distribución relativa de células B que expresan X de ratón en la superficie celular; los linfocitos de ratón 0011 (7655) son positivos para X de ratón; los linfocitos de ratón 0001 (7656) no expresan X de ratón significativa; los linfocitos de ratón de tipo silvestre (7777) expresan λ de ratón pero en un nivel relativamente inferior que el ratón 0011 (7655).

La Figura 52 muestra la distribución relativa de células B positivas para X de ratón endógena en comparación con κ humana (codificada por transgén). El panel superior izquierdo muestra los resultados de células de un ratón de tipo silvestre que posee alelos de cadena ligera y pesada endógenos funcionales y carece de un transgén o transgenes humanos; las células son positivas para lambda de ratón. El panel superior derecho muestra células de un ratón (N° 5822) que tiene un fondo *knockout* para κ (JKD++) y que alberga la integración de transgén κ humano de la línea KC1e-1399; las células son positivas para κ humana o X de ratón en cantidades aproximadamente proporcionales. El panel inferior izquierdo muestra células de un ratón (N° 7132) que tiene un fondo *knockout* para κ (JKD++) y que alberga la integración del transgén κ humano de la línea KC2-1610; más células son positivas para X de ratón que para κ humana, indicando posiblemente que la integración del transgén KC2-1610 es menos eficaz que la integración del transgén KC1e-1399. El panel inferior derecho muestra células de un ratón que alberga un transgén de minilocus κ humano (KC04) y carece de un alelo κ murino endógeno funcional. Los datos presentados en la Figura 52 demuestran también la variabilidad de la expresión fenotípica entre transgenes. Dicha variabilidad indica la conveniencia de seleccionar transgenes y/o líneas transgénicas individuales que expresen una o más características fenotípicas deseadas como resultado del transgén integrado (por ejemplo, cambio de isotipo, alto nivel de expresión, bajo fondo de Ig murina). Generalmente, se emplean por separado una sola o múltiples especies de transgén (por ejemplo, pKC1e, pKC2, KC04) para formar múltiples líneas transgénicas individuales que difieren por: (1) el transgén, (2) el sitio o sitios de integración del transgén y/o (3) el fondo genético. Se examinan líneas transgénicas individuales para determinar los parámetros deseados, tales como: (1) capacidad para montar una respuesta inmune contra un antígeno predeterminado, (2) frecuencia de cambio de isotipo dentro de las regiones constantes codificadas por transgén y/o frecuencia de cambio en trans a genes de la región constante de Ig endógena (por ejemplo, murina), (3) nivel de expresión de cadenas de inmunoglobulina codificadas por transgén y anticuerpos, (4) nivel de expresión de secuencias de inmunoglobulina endógenas (por ejemplo, murinas) y (5) frecuencia de reorganización de VDJ y VJ productiva. Típicamente, se seleccionan las líneas transgénicas que producen las mayores concentraciones de cadenas de inmunoglobulina codificadas por transgén (por ejemplo, humanas); preferiblemente, las líneas seleccionadas producen aproximadamente al menos 40 $\mu\text{g/ml}$ de cadena pesada codificada por transgén (por ejemplo, μ humana o γ humana) en el suero del animal transgénico y/o aproximadamente al menos 100 $\mu\text{g/ml}$ de cadena ligera codificada por transgén (por ejemplo, κ humana).

Se examinaron ratones para determinar su expresión de cadenas de inmunoglobulina humanas y murinas en su suero no inmunizado y en su suero después de la inmunización con un antígeno específico, CD4 humano. La Figura 53 muestra la expresión relativa de cadenas μ humanas, γ humanas, μ murinas, γ murinas, κ humanas, κ murinas y λ murinas presentes en el suero de cuatro ratones 0011 no inmunizados separados de diversos genotipos (nt = no ensayados); la κ humana predomina como la cadena ligera más abundante y μ humana y γ murina (supuestamente un producto de cambio en trans) son las cadenas pesadas más abundantes, con variabilidad entre líneas presente, indicando la utilidad de una etapa de selección para identificar combinaciones genotípicas ventajosas que minimicen la expresión de cadenas murinas al tiempo que permitan la expresión de cadenas humanas. Los ratones N° 6907 y 7088 muestran cambio de isotipo (cambio en cis dentro del transgén) de μ humana a γ humana.

La Figura 54 muestra niveles de cadena de inmunoglobulina en suero para μ (hu μ), μ humana (huy), κ humana (huk), μ murina (ms μ), γ murina (ms γ), κ murina (ms κ) y X murina (ms λ) en ratones de los diversos genotipos 0011.

ES 2 345 580 T3

Respuesta de Anticuerpos Específica en Ratones 0011

Un ratón 0011 (N° 6295) se inmunizó con una dosis inmunogénica de CD4 humano de acuerdo con el programa de inmunización siguiente: Día 0, inyección intraperitoneal de 100 μ l de suero inmune de ratón CD4, Día 1, se inyectan 20 μ g de CD4 humano (American Bio-Tech) sobre perlas de látex con DDA en 100 μ l; Día 15 se inyectan 20 μ g de CD4 humano (American Bio-Tech) sobre perlas de látex con DDA en 100 μ l; Día 29 se inyectan 20 μ g de CD4 humano (American Bio-Tech) sobre perlas de látex con DDA en 100 μ l; Día 43 se inyectan 20 μ g de CD4 humano (American Bio-Tech) sobre perlas de látex con DDA en 100 μ l.

La Figura 55 muestra la respuesta de anticuerpos relativa a la inmunización con CD4 a las 3 semanas y 7 semanas, demostrando la presencia de cadenas μ humanas, κ humanas y γ humanas en la respuesta anti-CD4. Las cadenas γ humanas están presentes en una abundancia significativamente aumentada en el suero de semana 7, indicando que el cambio en cis dentro del transgén de cadena pesada (cambio de isotipo) se está produciendo en una relación temporal similar a la del cambio de isotipo en un animal de tipo silvestre.

La Figura 56 muestra una recopilación esquemática de diversos transgenes de cadena ligera y cadena pesada humana.

Ejemplo 28

Este ejemplo proporciona la mutación *knockout* dirigida del locus de la cadena ligera X murina.

Inactivación Dirigida del locus de la Cadena Ligera Lambda Murina

A diferencia de los loci de la cadena ligera kappa y pesada de Ig, los segmentos génicos de $V\lambda J\lambda$ y $C\lambda$ murinos no están agrupados en 3 familias organizadas en una serie 5' a 3', sino que en su lugar están intercalados. La porción más 5' consiste en dos segmentos V ($V\lambda 2$ y $V\lambda X$) que vienen seguidos, avanzando en una dirección 3', por dos exones de región constante, cada uno asociado con su propio segmento J ($J\lambda 2C\lambda 2$) y el pseudogén $J\lambda 4C\lambda 4$). A continuación está el segmento V usado más ampliamente ($V\lambda 1$) que viene seguido por el segundo grupo de exones de región constante ($J\lambda 3C\lambda 3$ y $J\lambda 1C\lambda 1$). En su conjunto, el locus abarca aproximadamente 200 kb con intervalos de 20-90 kb entre los dos grupos.

La expresión del locus lambda implica la reorganización de $V\lambda 2$ o $V\lambda X$ predominantemente con $J\lambda 2$ y sólo rara vez adicionalmente 3' con $J\lambda 3$ o $J\lambda 1$. $V\lambda 1$ puede recombinarse tanto con $J\lambda 3$ como con $J\lambda 1$. Por lo tanto, el locus lambda puede mutarse para eliminar totalmente la recombinación y la expresión del locus.

La distancia entre los dos grupos de genes lambda hace difícil inactivar la expresión del locus por la generación de una sola delección dirigida compacta, como se usó en la inactivación de los loci de cadena ligera kappa y pesada de Ig murina. En su lugar, una pequeña delección única que eliminaría la expresión de cadenas ligeras lambda abarca aproximadamente 120 kb, prolongándose desde $J\lambda 2C\lambda 2$ a $J\lambda 1C\lambda 1$ (Figura 57). Esto elimina todos los exones de región constante lambda así como el segmento génico $V\lambda 1$, asegurando la inactivación del locus.

Se construyen vectores de dirección tipo sustitución (Thomas y Capecchi (1987) en la obra citada) en los que los 120 kb delecionados se sustituyen por el gen marcador de selección, neo, en un casete de expresión PGK. El marcador se incluye dentro de secuencias lambda génicas que flanquean la delección para proporcionar homología con el locus lambda y también puede contener el gen tk de HSV en el extremo de una de las regiones de homología para permitir el enriquecimiento en células que hayan integrado de forma homogénea los vectores. Se obtienen secuencias de clones genómicos de locus lambda por exploración de una biblioteca de fago genómica de cepa 129/Sv isogénica para la línea ES que se está sometiendo a mutación dirigida, puesto que se ha notificado que el uso de vectores de dirección isogénicos para el ADN cromosómico que se está sometiendo a mutación dirigida aumenta la eficacia de la recombinación homóloga. Se construyen vectores de dirección que difieren en sus longitudes de homología con el locus lambda. El primer vector (vector 1 en la Figura 58) contiene el gen marcador flanqueado por un total de aproximadamente 8-12 kb de secuencias de locus lambda. Para los acontecimientos de dirección en los que los vectores de sustitución median la adición o delección de unas pocas kb de ADN, se ha demostrado que esto es una extensión de homología más que suficiente (Hasty *et al.* (1991) en la obra citada; Thomas *et al.* (1992) en la obra citada). También se construyen vectores con aproximadamente 40-60 kb adicionales de secuencia lambda flanqueante (vector 2 en la Figura 58). Rutinariamente se clonan miniloci de Ig humana de al menos 80 kb y se propagan en el vector plasmídico pGP1 (Taylor *et al.* (1993) en la obra citada).

Una estrategia alternativa para la inactivación del locus lambda emplea dos mutaciones independientes, por ejemplo, mutaciones de los dos grupos de región constante o de los dos loci de región V, en la misma célula ES. Puesto que cada una de las dos regiones constantes está contenida en -6 kb de ADN, mientras que uno de los loci V abarca -19 kb, se construyen vectores de dirección para deleccionar de forma independiente los loci $J\lambda 2C\lambda 2/J\lambda 4C\lambda 4$ y $J\lambda 3C\lambda 3/J\lambda 1C\lambda 1$. Como se muestra en la Figura 58, cada vector consiste en un marcador de selección (por ejemplo, neo o pac) en un casete de expresión PGK rodeado por un total de -8-12 kb del ADN genómico de locus lambda que flanquea cada delección. El gen tk de HSV puede añadirse a los vectores de dirección para enriquecer a favor de acontecimientos de recombinación homólogos por selección positiva-negativa. Las células ES se someten a mutación

dirigida de forma secuencial con los dos vectores, de modo que se generan clones que llevan una delección de uno de los loci de la región constante; estos clones se someten después a mutación dirigida de forma secuencial con los dos vectores, de modo que se generarán clones que lleven una delección de uno de los loci de región constante y después estos clones se someten a mutación dirigida para generar una delección del grupo de región constante funcional restante. Puesto que ambos acontecimientos de dirección se están dirigiendo por lo tanto a la misma célula, es preferible usar un marcador de selección diferente para las dos mutaciones dirigidas. En el ejemplo esquemático mostrado en la Figura 58, uno de los vectores contiene el gen neo y el otro el gen pac (puromicina N-acetil transferasa). Un tercer marcador de selección dominante potencial es el gen hyg (higromicina fosfotransferasa). Tanto el gen pac como el hyg pueden insertarse en la construcción de expresión PGK usada con éxito para dirigir el gen neo a los loci de cadena ligera kappa y pesada de Ig. Puesto que los dos grupos de región constante lambda están estrechamente relacionados, es importante que las dos mutaciones residan en el mismo cromosoma. Existe preferiblemente una probabilidad del 50% de mutar el mismo alelo por dos acontecimientos de mutación dirigida independientes y la unión de las mutaciones se establece por su co-segregación durante la reproducción de quimeras derivadas de las células ES doblemente sometidas a mutación dirigida.

15

Ejemplo 29

Este ejemplo proporciona la mutación *knockout* dirigida del locus de cadena pesada murina.

20

Inactivación Dirigida del Locus de la Cadena Pesada Murina

Un transgén de dirección de gen de recombinación homóloga que tiene la estructura mostrada en la Figura 59 se usa para deleccionar al menos uno y preferiblemente sustancialmente todos los genes de región constante de locus de cadena pesada murina por mutación dirigida de genes en células ES. La Figura 59 muestra un diagrama esquemático general de un transgén de dirección. El segmento (a) es una secuencia de ADN genómico clonada localizada cadena arriba del gen o genes de la región constante que se va a deleccionar (es decir, proximal a los genes J_H); el segmento (b) comprende un marcador de selección positiva, tal como pgk-neo; el segmento (c) es una secuencia de ADN genómico clonada localizada cadena abajo del gen o genes de la región constante que se va a deleccionar (es decir, distal al gen o genes de la región constante y genes J_H); y el segmento (d), que es opcional, comprende un gen marcador de selección negativa (por ejemplo, tk de HSV). La Figura 60 muestra un mapa del locus de la cadena pesada murina según se tomó de Immunoglobulin Genes, Honjo, T, Alt, FW, y Rabbits TH (eds.) Academic Press, NY (1989) pág. 129.

30

Un transgén de dirección que tiene una estructura de acuerdo con la Figura 59, en la que: (1) el segmento (a) es el inserto de 11,5 kb del clon JH8.1 (Chen *et al.* (1993) Int. Immunol. 5: 647) o una porción equivalente que comprende aproximadamente al menos 1-4 kb de secuencia localizada cadena arriba del gen $C\mu$ murino, (2) el segmento (b) es pgk-neo como se ha descrito anteriormente, (3) el segmento (c) comprende la secuencia de 1674 pb mostrada en la Figura 61 o un inserto de 4-6 kb aislado de un clon de fago del gen $C\alpha$ de ratón aislado por exploración de una biblioteca de clon genómico de ratón con el oligonucleótido de extremo marcado que tiene la secuencia: 5'-gtg ttg cgt gta tca gct gaa acc tgg aaa cag ggt gac cag-3' y (4) el segmento (d) comprende el casete de expresión de tk de HSV descrito anteriormente.

35

Como alternativa, se realiza una delección por etapas de uno o más genes de región constante de cadena pesada en la que un primer transgén de dirección comprende regiones de homología, es decir, segmentos (a) y (c) homólogos a secuencias que flanquean un gen o genes de región constante, una primera especie de gen marcador de selección positiva (pgk-neo) y un marcador de selección negativo de tk de HSV. Por lo tanto, el segmento (a) puede comprender una secuencia de al menos aproximadamente 1-4 kb y homóloga a una región localizada cadena arriba de $C\gamma 3$ y el segmento (c) puede comprender una secuencia de al menos aproximadamente 1-4 kb y homóloga a una región localizada cadena arriba de $C\gamma 2a$. Este transgén de dirección delecciona los genes $C\gamma 3$, $C\gamma 1$, $C\gamma 2b$, y $C\gamma 2a$. Este primer transgén de dirección se introduce en células ES y se seleccionan recombinantes correctamente sometidos a mutación dirigida (por ejemplo, con G418) que producen una delección de región C correctamente dirigida. La selección negativa por pérdida del casete de tk de HSV se realiza después (por ejemplo, con ganciclovir o FIAU). Los recombinantes de primera ronda de delección C correctamente dirigida resultantes tienen un locus de cadena pesada que carece de los genes y $C\gamma 3$, $C\gamma 1$, $C\gamma 2b$, y $C\gamma 2a$.

50

Un segundo transgén de dirección comprende regiones de homología (es decir, segmentos (a) y (c) homólogos a secuencias que flanquean un gen o genes de la región constante, una segunda especie de gen marcador de selección positivo diferente que la primera especie (por ejemplo, gpt o pac) y un marcador de selección negativo de tk de HSV. Por lo tanto, el segmento (a) puede comprender una secuencia de al menos aproximadamente 1-4 kb y homóloga a una región localizada cadena arriba de $C\epsilon$ y el segmento (c) puede comprender una secuencia de al menos aproximadamente 1-4 kb y homóloga a una región localizada cadena arriba de $C\alpha$. Este transgén de dirección delecciona los genes de $C\epsilon$ y $C\alpha$.

55

Este segundo transgén de dirección se introduce en las células ES recombinantes de región C correctamente sometidas a mutación dirigida obtenidas del primer acontecimiento de dirección. Las células que están correctamente sometidas a mutación dirigida para el segundo acontecimiento de anulación (*knockout*) (es decir, por recombinación homóloga con el segundo transgén de dirección) se seleccionan con un fármaco de selección que es específico para la segunda especie del gen marcador de selección positiva (por ejemplo, ácido micofenólico para seleccionar para gpt;

60

puromicina para seleccionar para pac). Después se realiza selección negativa para la pérdida del casete de tk de HSV (por ejemplo, con ganciclovir o FIAU). Estos recombinantes de segunda ronda de región C correctamente sometidos a mutación dirigida resultantes tienen un locus de cadena pesada que carece de los genes $C\gamma 3$, $C\gamma 1$, $C\gamma 2b$, $C\gamma 2a$, $C\epsilon$ y $C\alpha$.

5 Se usan células ES recombinantes de primera ronda o segunda ronda correctamente sometidas a mutación dirigida que carecen de uno o más genes de la región C para inyecciones de blastocistos como se ha descrito (anteriormente) y se producen ratones quiméricos. Se establece la transmisión de línea germinal de los alelos de cadena pesada sometidos a mutación dirigida y se realiza el cruce de los ratones fundadores resultantes para generar ratones homocigotos
10 *knockout* para la región C. Dichos ratones *knockout* para la región C tienen varias ventajas en comparación con los ratones *knockout* para J_H ; por ejemplo, los ratones *knockout* para la región C tienen una capacidad disminuida (o carecen completamente de la capacidad) de experimentar cambio en trans entre un transgén de cadena pesada humana y una región constante de locus de cadena pesada endógena, reduciendo de este modo la frecuencia de cadenas pesadas humana/de ratón quiméricas en el ratón transgénico. Se prefiere el *knockout* de los genes gamma murinos, aunque
15 también delecionan frecuentemente μ y delta por dirección homóloga. El *knockout* para la región C puede realizarse junto con otras lesiones dirigidas en el locus de cadena pesada murina endógeno; una deleción de región C puede combinarse con un *knockout* de J_H para impedir la reorganización VDJ productiva del locus de cadena pesada murina y para impedir o reducir el cambio en trans entre un transgén de cadena pesada humana y el locus de cadena pesada murina, entre otros. Para algunas realizaciones, puede ser deseable producir ratones que carezcan específicamente de uno o más genes de región C del locus de cadena pesada endógena pero que conserven otros genes determinados de región C; por ejemplo, puede ser preferible conservar el gen $C\alpha$ murino para permitir la producción de IgA humana/de ratón quimérica por cambio en trans, si dicha IgA confiere un fenotipo ventajoso y no interfiere sustancialmente con la utilidad deseada del ratón.

25 Ejemplo 30

Este ejemplo demuestra la reducción *ex vivo* del número de linfocitos que expresan una inmunoglobulina endógena (murina) a partir de una muestra de linfocitos obtenida de un ratón transgénico que alberga un transgén humano. Los
30 linfocitos que expresan Ig murina se reducen selectivamente por unión específica a un anticuerpo anti-inmunoglobulina murina que carece de una unión sustancial a inmunoglobulinas humanas codificadas por el transgén o transgenes.

Reducción Ex Vivo del Número de Células B que Expresan Ig Murina

35 Un ratón homocigoto para un transgén de minilocus de cadena pesada humana (HC2) y un transgén de minilocus de cadena ligera humana (KCo4) se cruza con un ratón endogámico C57BL/6 (B6) para obtener ratones 2211 (es decir, ratones que son homocigotos para un locus de cadena pesada murina endógeno funcional, son homocigotos para un locus de cadena ligera murina endógeno funcional y que poseen una copia de un transgén de cadena pesada humana y una copia de un transgén de cadena ligera humana). Dichos ratones 2211 también expresan antígenos mayores y menores de histocompatibilidad B6. Estos ratones se sensibilizan con una dosis inmunogénica de un antígeno y después de aproximadamente una semana se aíslan las células de bazo. Se extirpan las células B positivas para Ig murina mediante
40 separación de células dependiente de anticuerpos acoplados a fase sólida de acuerdo con métodos convencionales (Wysocki *et al.* (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 75: 2844; MACS magnetic cell sorting, Miltenyi Biotec Inc., Sunnyvale, CA), seguido de lisis celular mediada por el complemento dependiente de anticuerpos (Selected Methods in Cellular Immunology, Mishell BB y Shiigi SM (eds.), W. H. Freeman and Company, Nueva York, 1980, págs. 211-212) para eliminar sustancialmente las células residuales positivas para Ig murina. Las células restantes en la muestra reducida (por ejemplo, células T, células B positivas para Ig humana) se inyectan i.v., preferiblemente junto con anticuerpo anti-Ig murina adicional para reducir las células B que surgen en un ratón SCID/B6 o RAG/B6. El ratón reconstituido se inmuniza después adicionalmente para el antígeno para obtener anticuerpo y células maduras por
50 afinidad para producir clones de hibridoma.

Ejemplo 31

55 *Producción de Anticuerpos Totalmente Humanos en Quimeras Somáticas*

Se describe un método para producir anticuerpos totalmente humanos en ratones quiméricos somáticos. Estos ratones se generan por introducción de células madre embrionarias (ES) que llevan transgenes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina (Ig) humana y que carecen de genes de cadena ligera kappa y pesada de Ig murina funcionales en
60 blastocistos de ratones deficientes en RAG-1 o RAG-2.

Los ratones deficientes en RAG-1 y RAG-2 (Mombaerts *et al.* (1992) Cell 68: 869; Shinkai *et al.* (1992) Cell 68: 855) carecen de células B y T murinas debido a una incapacidad para iniciar la reorganización de VDJ y ensamblar los segmentos génicos que codifican Ig y receptores de células T (TCR). Este efecto en la producción de células B y T puede complementarse por inyección de células ES de tipo silvestre en blastocistos derivados de animales deficientes en RAG-2. Los ratones quiméricos resultantes producen células B y T maduras derivadas en su totalidad de las células ES inyectadas (Chen *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4528).

ES 2 345 580 T3

La manipulación genética de las células ES inyectadas se usa para introducir mutaciones definidas y/o construcciones de ADN exógeno en todas las células B y/o T de las quimeras. Chen *et al.* (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4528-4532, generaron células ES que llevaban una inactivación homocigota del locus de cadena pesada de Ig que, cuando se inyectaba en blastocistos de RAG, producía quimeras que generaban células T en ausencia de células B. La transfección de una cadena pesada murina reorganizada en las células ES mutantes da como resultado el rescate del desarrollo de células B y la producción de células tanto B como T en las quimeras.

Pueden generarse ratones quiméricos que expresan anticuerpos totalmente humanos en ausencia de síntesis de cadena ligera kappa o cadena pesada de Ig murina. Se introducen construcciones de cadena ligera y pesada de Ig humana en células ES homocigotas para la inactivación de los genes de cadena tanto ligera kappa como pesada de Ig murina. Las células ES se inyectan después en blastocistos derivados de ratones deficientes en RAG2. Las quimeras resultantes contienen células B derivadas exclusivamente de las células ES inyectadas que son incapaces de expresar genes de cadena ligera kappa y pesada de Ig murina pero que expresan genes de Ig humana.

15 *Generación de células ES Homocigotas para la Inactivación de los Genes de Cadena Ligera Kappa y Pesada de Inmunoglobulina*

Se generaron ratones que llevaban loci de cadena ligera kappa y pesada de Ig inactivados por delección dirigida, en células ES, de las secuencias J_H y J_K/C_K de Ig, respectivamente, de acuerdo con procedimientos conocidos (Chen *et al.* (1993) EMBO J. 12: 821; y Chen *et al.* (1993) Int. Immunol, en la obra citada). Las dos cepas mutantes de ratones se cruzaron entre sí para generar una cepa homocigota para la inactivación de ambos loci de Ig. Esta cepa doble mutante se usó para la obtención de células ES. El protocolo usado era esencialmente el descrito por Robertson (1987, en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, pág. 71-112, editado por E. J. Robertson, IRL Press). En resumen, se generaron blastocistos por emparejamientos naturales de ratones dobles mutantes homocigotos. Hembras gestantes se sometieron a ovariectomía en día 2,5 de la gestación y los blastocistos “retrasados” se extrajeron por lavado abundante del útero el día 7 de gestación y se cultivaron sobre células alimentadoras para ayudar a mantener su estado indiferenciado. Se escogieron células madre de la masa celular interna de los blastocistos, identificables por su morfología, se disociaron y se pasaron sobre células alimentadoras. Se identificaron células con un cariotipo normal y se ensayarán líneas celulares masculinas por su capacidad para generar quimeras y contribuir a las células germinales del ratón. Son preferibles células ES masculinas respecto a líneas femeninas puesto que una quimera masculina puede producir significativamente más descendencia.

Introducción de Genes de Ig Humana en Células ES Deficientes en Cadena Ligera Kappa y Pesada de Ig de Ratón

Se introdujeron genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humana en las células ES mutantes como construcciones de minilocus, tales como HC2 y KC-C04 o como clones YAC, tales como J1.3P. La transfección de células ES con ADN de Ig humana se lleva a cabo por técnicas tales como electroporación o lipofección con un lípido catiónico. Para permitir la selección de células ES que han incorporado el ADN humano, se liga un marcador de selección con las construcciones o se introduce por cotransfección con las construcciones en células ES. Puesto que las células ES mutantes contienen el gen de neomicina fosfotransferasa (neo) como resultado de los acontecimientos de dirección génica que generaban las inactivaciones de genes de Ig, se usan diferentes marcadores de selección, tales como higromicina fosfotransferasa (hyg) o puomicina N-acetil transferasa (pac) para introducir los genes de Ig humana en las células ES.

Los genes de cadena ligera y pesada de Ig humana pueden introducirse simultáneamente o de forma secuencial usando diferentes marcadores de selección en las células ES mutantes. Después de la transfección, se seleccionan células con el marcador de selección apropiado y se expanden colonias resistentes a fármacos para su congelación y para el análisis de ADN para verificar y analizar la integración de las secuencias génicas humanas.

50 *Generación de Quimeras*

Se inyectan clones ES que contienen genes de cadena ligera y pesada de Ig humana en blastocistos de RAG-2 como se describe (Bradley, A. (1987), en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, pág. 113-151, editado por E. J. Robertson, IRL Press) y se transfieren a los úteros de hembras pseudogestantes. Se explora la descendencia para determinar la presencia de anticuerpos humanos por ensayo ELISA de muestras de suero. Se usan los animales positivos para la inmunización y la producción de anticuerpos monoclonales humanos.

60 Ejemplo 32

Este ejemplo describe la introducción, por recombinación homóloga en células ES, de una mutación de desplazamiento de fase de lectura dirigida en el locus de cadena pesada murina que conduce a una delección de células B que experimentan recombinación de cambio. Los ratones con cambio de fase de lectura son hospedadores adecuados para albergar transgenes no murinos (por ejemplo, humanos) que codifiquen inmunoglobulinas de secuencia humana.

Los nuevos ratones con cambio fase de lectura pueden usarse para expresar inmunoglobulinas de secuencia no murina (por ejemplo, humana) codificadas por uno o más transgenes de cadena pesada y/o uno o más transgenes de cadena ligera y para el aislamiento de hibridomas que expresen anticuerpos de secuencia humana madurados por

ES 2 345 580 T3

afinidad con cambio de clase a partir de transgenes introducidos, entre otros usos. Un desplazamiento de fase de lectura se introduce en uno de los cuatro segmentos génicos JH de ratón y en el primer exón del gen μ de ratón. Las dos mutaciones de desplazamiento de fase de lectura introducidas se compensan entre sí permitiendo de este modo la expresión de cadena pesada μ murina totalmente funcional cuando una célula B usa el JH con desplazamiento de fase de lectura para una unión VDJ funcional. No puede usarse ninguno de los otros tres segmentos JH para una unión VDJ funcional debido al desplazamiento de fase de lectura en μ , que no está compensado en los genes JH restantes. Como alternativa, pueden generarse por ingeniería genética desplazamientos de fase de lectura compensatorios en múltiples genes JH murinos.

Un homocigoto de ratón para un alelo de cadena pesada de inmunoglobulina con desplazamiento de fase de lectura compensado tiene un nivel aproximadamente fisiológico de células B periféricas y un nivel aproximadamente fisiológico de IgM en suero que comprende tanto μ murina como humana. Sin embargo, las células B reclutadas en centros germinales frecuentemente experimentan un cambio de clase a un isotipo no μ . Dicho cambio de clase en células B que expresan la cadena μ murina endógena conduce a la expresión de un ARNm con desplazamiento de fase de lectura no compensado, puesto que los genes C_H no μ restantes no poseen un desplazamiento de fase de lectura compensatorio. Las células B resultantes no expresan un receptor de células B y se delecionan. Por lo tanto, las células B que expresan una cadena pesada murina se delecionan una vez que alcanzan la fase de diferenciación en la que se produce el cambio de isotipo. Sin embargo, las células B que expresan cadenas pesadas codificadas con un transgén no murino (por ejemplo, humano) capaces de experimentar cambio de isotipo y que no contienen dichos desplazamientos de cambio de lectura restrictivos por isotipo son capaces de un desarrollo adicional, incluyendo el cambio de isotipo y/o la maduración por afinidad y similares.

Por lo tanto, el ratón con desplazamiento de fase de lectura tiene una respuesta secundaria alterada con respecto a la cadena pesada murina (μ), pero una respuesta secundaria significativa con respecto a cadenas pesadas codificadas por transgén. Si un transgén de cadena pesada que es capaz de experimentar un cambio de clase se introduce en este fondo mutante, la respuesta secundaria no IgM está dominada por células B de expresión de transgén. Por lo tanto, es posible aislar hibridomas de expresión de inmunoglobulina de secuencia humana madurados por afinidad a partir de estos ratones con desplazamiento de la fase de lectura. Además, los ratones con desplazamiento de la fase de lectura poseen generalmente niveles inmunoprotectores de IgM murina que pueden ser ventajosos cuando el transgén de cadena pesada humana puede codificar sólo un repertorio limitado de regiones variables.

Para generar hibridomas que secreten anticuerpos monoclonales de secuencia humana, se inmunizan ratones transgénicos mutantes; sus bazos se fusionan con una línea celular de mieloma; y los hibridomas resultantes se exploran para determinar la expresión del isotipo no μ humano codificado por transgén. Además, el ratón con desplazamiento de fase de lectura puede ser ventajoso sobre un ratón con JH delecionada porque contendrá una secuencia de cambio de μ funcional adyacente a un VDJ transcrito que sirve como sustrato activo para el cambio en cis (Gu *et al.* (1993) Cell 73: 1155); reduciendo de este modo el nivel de células B con cambio en trans que expresan anticuerpos de ratón/humanos quiméricos.

40 *Construcción de Vectores con Desplazamiento de Fase de Lectura*

Se construyen dos vectores con desplazamiento de fase de lectura separados. Uno de los vectores se usa para introducir 2 nucleótidos en el extremo 3' del segmento génico J4 de ratón y uno de los vectores se usa para delecionar los mismos dos nucleótidos del extremo 5' del exón 1 del gen μ de ratón.

45 1. *Vector JH*

Un fragmento XhoI/EcoRI de 3,4 kb que abarca la región J de cadena pesada de ratón y el potenciador intrónico de μ se subclonan en un vector plasmídico que contiene un gen de resistencia a neomicina así como un gen de timidina quinasa de herpes bajo el control de un promotor del fosfoglicerato quinasa (casete tk/neo; Hasty *et al.*, (1991) Nature 350: 243). Después, este clon se usa como sustrato para generar 2 fragmentos de PCR diferentes usando los cebadores oligonucleotídicos siguientes:

- 55 o-A1 5' – cca cac tct gca tgc tgc aga agc ttt tct gta – 3' (SEC ID N°: 161)
o-A2 5' – ggt gac tga ggt acc ttg acc cca gta gtc cag – 3' (SEC ID N°: 162)
o-A3 5' – ggt tac ctc agt cac cgt ctc ctc aga ggt aag aat ggc ctc – 3' (SEC
60 ID N°: 163)
o-A4 5' – agg ctc cac cag acc tct cta gac agc aac tac – 3' (SEC ID N°: 164)

Los oligonucleótidos o-A1 y o-A2 se usan para amplificar un fragmento de 1,2 kb que se digiere con SphI y KpnI. Los oligonucleótidos o-A3 y o-A4 se usan para amplificar un fragmento de 0,6 kb que se digiere con KpnI y XbaI. Estos dos fragmentos diferidos se clonan después en el plásmido A digerido con SphI/XbaI para producir el plásmido B.

ES 2 345 580 T3

El plásmido B contiene la inserción de 2 nucleótidos en el extremo de J4 y, además, contiene un nuevo sitio kpnI cadena arriba de la inserción. El sitio KpnI se usa como marcador de diagnóstico para la inserción.

5 Pueden clonarse secuencias flanqueantes adicionales en el sitio XhoI 5' y el sitio EcoRI 3' del plásmido B para aumentar su eficacia de recombinación homóloga. El plásmido resultante se digiere después con SphI u otra enzima de restricción con uno solo sitio dentro del inserto, y se introduce por electroporación en células madre embrionarias que después se seleccionan con G418 como se describe por Hasty *et al.* (1991) en la obra citada. Se identifican recombinantes homólogos mediante hibridación por transferencia de Southern y después se seleccionan con FIAU como se describe por Hasty *et al.* para obtener subclones delecionados que contienen sólo la inserción de 2 pares de bases y el nuevo sitio KpnI en JH4. Éstos se identifican mediante hibridación de transferencia de Southern de ADN digerido con KpnI y se confirman por análisis de secuencia de ADN de JH4 amplificada por PCR.

El ratón resultante contiene un segmento JH4 que se ha convertido a partir de la secuencia no mutada:

15 ... TGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAG__gtaagaatggcctctcc...

(SEC ID N°: 165)

20 TrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSer (SEC ID N°: 166)

en la secuencia mutante:

25 ... TGGGGTCAAGGTACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGAGgtaagaatggcctctcc...

(SEC ID N°: 167)

30 TrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSerGlu (SEC ID N°: 168)

Vector de Exón 1 de μ

35 Usando una metodología de mutagénesis *in vitro* similar a la descrita anteriormente para generar por ingeniería genética un inserción de dos pares de bases en el segmento génico JH4, se ensamblan productos de PCR y subclones genómicos para generar un vector que contiene una deleción de dos pares de bases en el extremo 5' del primer exón de μ . Además, para marcar la mutación también se introduce un nuevo sitio XmnI cadena abajo por cambio de una A a una G.

40 La secuencia del gen μ no mutado es:

... ctggtcctcagAGAGTCAGTCCTTCCCAAATGTCTTCCCCCTCGTC... (SEC ID N°: 169)

45 GluSerGlnSerPheProAsnValPheProLeuVal (SEC ID N°: 170)

La secuencia del gen μ mutado es:

50 XmnI
... ctggtcctcag__AGTCAGTCCTTCCCGAATGTCTTCCCCCTCGTC... (SEC ID N°: 171)

55 SerGlnSerPheProAsnValPheProLeuVal (SEC ID N°: 172)

60 El vector de recombinación homóloga que contiene la secuencia mutante se linealiza y se introduce por electroporación en una línea celular ES que contiene la inserción JH4. Se identifican recombinantes homólogos a partir de clones resistentes a neomicina. Los recombinantes homólogos que contienen la inserción de desplazamiento de fase de lectura en el mismo cromosoma que la inserción JH4 se identifican por hibridación de transferencia de Southern de ADN digerido con KpnI/BamHI. La inserción JH4 se asocia con un nuevo sitio KpnI que reduce el tamaño del intrón J- μ que contiene el fragmento KpnI/BamHI del tipo silvestre de 11,3 kb a un mutante de 9 kb. Los clones resultantes se seleccionan después para la deleción del casete tk/neo insertado usando FIAU. Los clones que contienen el exón de μ mutante se identifican por hibridación de transferencia de Southern de ADN digerido con XmnI. La mutación se confirma por análisis de secuencia de ADN del ADN de exón1 de μ amplificado.

ES 2 345 580 T3

Generación de Ratones con Desplazamiento de Fase de Lectura

La línea celular ES que contiene tanto la inserción de dos pares de bases en JH4 como la delección de dos pares de bases en el exón 1 de μ se introduce después en embriones en fase blastocística que se insertan en hembras pseudo-gestantes para generar quimeras. Los animales quiméricos se cruzan para obtener transmisión de línea germinal y los animales resultantes se cruzan hasta la homocigosidad para obtener animales mutantes homocigotos para loci de cadena pesada con desplazamiento de fase de lectura compensado y que tienen respuestas inmunes humorales secundarias alteradas en células B que expresan cadenas pesadas murinas.

Un transgén de cadena pesada humana tal como por ejemplo pHC1 o pHC2 y similares puede reproducirse en el fondo de desplazamiento de fase de lectura de cadena pesada murino por cruce de ratones que albergan dicho transgén humano en ratones que tienen el locus de IgH murina con desplazamiento de fase lectura. Por cruzamiento y retrocruzamiento, se producen ratones homocigotos en el locus de IgH murina para alelos de IgH murina con desplazamiento de fase de lectura compensado y μ (es decir, capaces de compensar la expresión en fase de lectura solamente de cadenas μ murinas y no de cadenas no μ murinas) y que albergan al menos una copia integrada de un transgén de cadena pesada humana funcional (por ejemplo pHC1 o pHC2). Dichos ratones pueden contener opcionalmente loci *knockout* de κ y/o λ murina endógena, como se ha descrito anteriormente, y pueden opcionalmente comprender un transgén de cadena ligera no murina humana o de otro tipo (por ejemplo, pKC1e, pKC2 y similares).

Como alternativa, el transgén o transgenes humanos (pesado y/o ligero) pueden comprender desplazamiento de fase de lectura compensatorios de modo que el gen o genes del transgén J contengan un desplazamiento de fase de lectura que esté compensado por un desplazamiento de fase de lectura en el gen o genes de la región constante del transgén. El cambio en trans a los genes de región constante endógenos no está compensado y produce un producto truncado o sin sentido; las células B que expresan dichas inmunoglobulinas con cambio en trans no compensadas se seleccionan en contra y se reducen.

Ejemplo 33

Inactivación de Cadena Pesada Endógena por Eliminación de la Región D

Este ejemplo describe un vector de recombinación homóloga de selección positiva y negativa para sustituir la región D de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal de ratón con un segmento VDJ reorganizado no funcional. El alelo resultante funciona dentro de una célula B como alelo no productivo normal, experimentando el alelo cambio de clase de cadena pesada intra-alélico, reduciendo de este modo el nivel de cambio en trans a un locus de transgén activo.

Construcción de Dirección de Región D

Un fragmento de ADN de 8-15 kb localizado cadena arriba de la región D murina se aísla y se subclona a partir de una biblioteca de fago de cepa 129 de ratón usando una sonda oligonucleotídica que comprende aproximadamente 50 nucleótidos consecutivos de la secuencia publicada para el segmento DFL16.1 enumerado en GenBank. DFL16.1 es el segmento D cadena arriba (es decir, proximal al grupo de genes de región V y distal al grupo de genes de región constante).

De forma similar, se aísla un fragmento BamHI de 9,5 kb que contiene JH3, JH4, E_{μ} , S_{μ} y los dos primeros exones codificantes de la región constante μ y se subclonan a partir de una biblioteca de fago genómica de cepa 129 de ratón.

Después se aísla un VDJ reorganizado de 5-10 kb a partir de un hibridoma de ratón (cualquier cepa) y se inserta un enlazador sintético que contiene un codón de terminación en el segmento J. El enlazador de terminación dentro de J es preferible respecto a una unión VDJ fuera de fase de lectura debido a la posibilidad de reorganizaciones de sustitución de V.

Estos tres fragmentos se ensamblan entre sí con un casete de selección positiva pGKneo y un casete de selección negativa PGKHSVtk para formar un vector de selección positiva-negativa para eliminar la región D de ratón en células ES derivadas de 129 (por ejemplo, AB1) por recombinación homóloga. El vector de dirección se forma por ligación del fragmento de ADN de 8-15 kb con el casete de selección positiva (por ejemplo, pGKneo), que está de por sí ligado al VDJ reorganizado de 5-10 kb reorganizado, que está de por sí ligado al fragmento BamHI de 9,5 kb; el casete de selección negativa (por ejemplo, PGKHSVtk) se liga después a cualquier extremo de la construcción de dirección. La construcción de dicho vector de dirección de región D se muestra esquemáticamente en la Figura 63.

La construcción de dirección de región D se transfiere a células ES AB1, se realiza selección positiva y negativa como se ha descrito anteriormente y se clonan células ES correctamente sometidas a mutación dirigida. Los clones de células ES correctamente sometidos a mutación dirigida se usan para inyecciones de blastocitos y se producen ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se cruzan para producir ratones fundadores que albergan un alelo de cadena pesada de región D inactivada. El cruce de distintas cepas de descendencia se realiza para producir homocigotos que carezcan de un locus de cadena pesada endógeno funcional. Dichos homocigotos se usan para cruzar ratones que albergan transgenes de Ig humana (por ejemplo, pHC1, pHC2, pKC2, pKC1e, KCo4) para dar (por retrocruzamiento adicional

ES 2 345 580 T3

con los homocigotos que carecen de una región D funcional) ratones que carecen de un locus de cadena pesada endógeno funcional y que albergan un transgén de cadena pesada humana (y preferiblemente también un transgén de cadena ligera humana). En realizaciones en las que continuarán existiendo algunos loci de cadena ligera endógena funcionales (por ejemplo, loci λ), generalmente se prefiere que los transgenes contengan secuencias de control de la transcripción que dirijan una expresión de alto nivel de polipéptidos de cadena ligera humana (por ejemplo, κ) y, por lo tanto, permitan que el locus de transgén compita eficazmente con los loci de cadena ligera endógena restantes (por ejemplo, X). Por ejemplo, generalmente se prefiere el transgén de la cadena ligera kappa Co4 en comparación con pKC1 con respecto a la capacidad para competir eficazmente con los loci X endógenos en el animal transgénico.

10 Ejemplo 34

Este ejemplo describe la expansión del repertorio de genes V del transgén de cadena ligera humana por co-inyección de un minilocus de cadena ligera κ humana y un cromosoma artificial de levadura que comprende una porción del locus V_{κ} humano.

Introducción de Segmentos V de Cadena Ligera Humana Funcionales por Co- inyección de ADN de YAC que Contiene V_{κ} y un Minilocus κ

20 Se obtuvo un clon de YAC de aproximadamente 450 kb que contenía parte del locus V_{κ} humano como un ADN de YAC no amplificado del clon 4x17E1 de la biblioteca de YAC ICRF disponible públicamente (Larin *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 4123; Genome Analysis Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, Londres, Reino Unido). El clon de YAC de 450 kb se aisló sin una amplificación previa por electroforesis en gel de campo pulsado convencional de acuerdo con las especificaciones del fabricante (CHEF DR-II electrophoresis cell, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Se tiñeron seis geles de campo pulsado individuales con bromuro de etidio y el material de gel que contenía el ADN del clon de YAC se escindió del gel y después se incluyó en un nuevo molde de gel (agarosa de bajo punto de fusión en un tampón de gel convencional) en una bandeja de gel triangular. El gel triangular resultante (que contenía los seis bloques de gel que contienen YAC escindidos) se prolongó en el vértice con un gel de agarosa estrecho con NaOAc 2 M además del tampón de electroforesis convencional. Después, el gel se colocó en una cámara de electroforesis sumergida en tampón de gel convencional. La sustancia formadora de gel en forma de Y se eleva sobre la superficie del tampón de modo que la corriente sólo puede fluir hacia la porción de gel de alto contenido en sales estrecha. Se colocó un bloque de plexiglás sobre el corte de gel de alto contenido en sales para evitar la difusión del NaOAc hacia el tampón. El ADN del YAC se sometió después a electroforesis fuera del corte de gel escindido original (incluido) y en la porción de gel de alto contenido en sales estrecha. En el punto de transición desde el gel de bajo contenido en sales al gel de alto contenido en sales existe una caída de la resistencia que detiene eficazmente la migración del ADN en el vértice del gel triangular.

Después de la electroforesis y de la tinción con bromuro de etidio, el ADN de YAC concentrado se extrajo por corte del resto del gel y la agarosa se digirió con GELase (EpiCentre Technologies, Madison, Wisconsin). Después se añadió cloruro de cesio al líquido que contenía YAC resultante para obtener una densidad de 1,68 g/ml. Esta solución se centrifugó a 37.000 rpm durante 36 horas para separar el ADN de YAC de cualquier material contaminante. Se aislaron fracciones de 0,5 ml de gradiente de densidad resultante y la fracción de ADN máxima se dializó contra Tris 5 M (pH 7,4), NaCl 5 mM y EDTA 0,1 M. Después de la diálisis, se descubrió que la concentración de la solución de 0,65 ml resultante de ADN de YAC contenía 2 μ g/ml de ADN. Este ADN de YAC se mezcló con un inserto de ADN purificado de los plásmidos pKC1B y pKV4 a una proporción de 20:1:1 (microgramos YAC4x17E1:KC1B:KV4). La solución de 2 μ g/ml resultante se inyectó en los pronúcleos de embriones de B6CBF2 de medio día y se transfirieron 95 embriones microinyectados supervivientes a los oviductos de hembras pseudogestantes. Nacieron doce ratones desarrollados a partir de los embriones microinyectados.

50 Ejemplo 35

Este ejemplo describe el cambio de clase, mutación somática y desarrollo de células B en ratones transgénicos inmunizados homocigotos para un locus de inmunoglobulina endógena inactivado y que contienen el transgén o transgenes de cadena pesada HC1 o HC2.

Para demostrar que un minilocus de configuración de línea germinal de secuencia humana puede sustituir funcionalmente al locus auténtico, se cruzó una cepa de ratón que carecía de IgH endógena con cepas que contenían los transgenes de IgH de configuración de línea germinal humana. Los dos miniloci de transgén, HC1 y HC2, incluyen uno y cuatro segmentos variables funcionales (V) respectivamente, 10 y 16 segmentos de diversidad (D) respectivamente, los seis segmentos de unión (JH) y los segmentos de región constante tanto μ como γ 1. Los miniloci incluyen secuencias reguladoras que actúan en cis humanas tales como el potenciador intrónico de μ -JH y las secuencias de cambio μ y γ 1 -- que se unen estrechamente a los segmentos codificantes. También incluyen un elemento potenciador adicional derivado del extremo 3' del locus de IgH de rata. Se cruzaron ratones transgénicos HC1 y HC2 con ratones mutantes derivados de células madre que carecían de segmentos JH (ratones JHD) como se describe (anteriormente) y que, por lo tanto, no podían experimentar reorganizaciones de cadena pesada pesada pesada introducidas. Los ratones JHD transgénicos resultantes contienen células B que dependen de las secuencias de cadena pesada pesada pesada introducidas.

Inmunizaciones e hibridomas

Se inmunizaron ratones por inyecciones intraperitoneales de 50.100 μg de antígeno. Los antígenos incluían antígeno carcinoembrionario humano (CEA; Crystal Chem, Chicago, IL), lisozima de clara de huevo de gallina (HEL; Pierce, Rockford, IL) y hemocianina de lapa californiana (KLH; Pierce, Rockford, IL). Para las inyecciones primarias se mezcló el antígeno con adyuvante completo de Freund, y para las inyecciones posteriores se usó adyuvante incompleto de Freund (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Se fusionaron células de bazo con el mieloma de ratón no secretor P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL1580). Se ensayaron muestras de suero y sobrenadantes de hibridoma para determinar la presencia de anticuerpo específico e inespecífico que comprendía secuencias de cadena pesada humana por ELISA. Para la detección de anticuerpos inespecíficos, se recubrieron pocillos de microtitulación con anticuerpo específico de isotipo de cadena pesada humana (MAB de ratón anti-IgG1 humana, clon HP6069, Calbiochem, La Jolla, CA; MAB de ratón anti-IGM humana, clon CH6, The Binding Site, Birmingham, Reino Unido) y se revelaron con antisuero conjugado con peroxidasa (fragmento de fab purificado por afinidad conjugado con peroxidasa de rábano picante procedente de anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG (fc) humana, n° cat. 109-036-098; anticuerpo policlonal de conejo anti-IgM (fc) humana conjugado con peroxidasa de rábano picante purificado por afinidad, n° cat 309-035-095. Jackson Immuno Research, West Grove, PA). Para la detección de anticuerpos específicos de antígeno, se recubrieron pocillos de microtitulación con antígeno y se revelaron con antisueros específicos de isotipo de cadena pesada humana conjugados con peroxidasa. Se detectó la peroxidasa unida por incubación con peróxido de hidrógeno y ácido 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-Sulfónico, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). El producto de reacción se midió por absorción a 415 m y se corrigió con respecto a la absorción a 490 nm.

Citometría de Flujo

Se prepararon suspensiones de una sola célula a partir de células de bazo, médula ósea y cavidad peritoneal y se lisaron eritrocitos con KH_4Cl , como se describe por Mishell y Shiigi. Los linfocitos se tiñeron con los reactivos siguientes: anti-Ig κ de ratón conjugado con ficoeritrina (clon X36; Becton Dickinson, San José, CA), anti-IgD de ratón conjugado con FITC (clon SBA 1, Southern Biotech, AL), anti-CD5 de ratón conjugado con FITC (clon 53-7.3; Becton Dickinson, San José, CA), anti-Ig λ de ratón conjugado con FITC (clon R26-46; Pharmingen, San Diego, CA) y anti-B220 de ratón conjugado con Cy-Chrome (clon RA3-6B2; Pharmingen, San Diego, CA). Se analizaron las células teñidas usando un citómetro de flujo FACScan y el programa informático LYSIS II (Becton Dickinson, San José, CA). La mayoría de los macrófagos, neutrófilos y eritrocitos residuales se excluyeron por selección sobre dispersión hacia adelante y lateral.

Rescate de compartimento de células B

En la cavidad peritoneal de animales de JHD transgénico HC1 se encuentran niveles normales de células B CD5⁺ y aproximadamente un cuarto del nivel normal de células B CD5⁻ convencionales. Las células B CD5⁺ peritoneales transgénicas son similares a las denominadas células B-1 descritas en animales normales: son de mayor tamaño que los linfocitos B y T convencionales, expresan menores niveles de B220 que las células B convencionales que se encuentran en el bazo e incluyen una mayor proporción de células de expresión de cadena ligera X. Más del 90% de las células B esplénicas expresan κ , mientras que hasta el 50% de las células B peritoneales expresan X. Por lo tanto, aunque el nivel de células B convencionales se reduce uniformemente en todos los tejidos, el nivel de B-1, que se ha informado que tiene una capacidad mucho mayor de auto-renovación, parece ser normal en los animales de JHD transgénica HC1.

Cambio de Clase

En ratones de JHD transgénica, la exposición repetida al antígeno da como resultado la producción de anticuerpos $\gamma 1$ humanos, así como anticuerpos μ . Se inyectó CEA humano en ratones de JHD transgénica a intervalos semanales y se controlaron los niveles séricos de IgM e IgG1 específica de antígeno durante un periodo de cuatro semanas (Figura 63). Después de una semana había una respuesta de IgM detectable pero no respuesta de IgG1. Sin embargo, la respuesta de IgG1 es superior a la respuesta de IgM después de dos semanas y continúa aumentando mientras que la respuesta de IgM permanece relativamente constante. Este patrón de una reacción de IgM inicial seguido de una reacción de IgG es típico de una respuesta inmune secundaria; y sugiere que las secuencias que actúan en cis incluidas en el transgén pueden estar respondiendo a citocinas que dirigen el cambio de clase. Se han considerado tres mecanismos posibles para la expresión de isotipos no μ , habiéndose discutido cada uno de ellos en la bibliografía. Estos mecanismos son: corte y empalme alternativo que no implica delección del gen μ ; cambio de "tipo δ ", que implicaba la delección del gen μ por recombinación homóloga entre secuencias de repetición flanqueantes; y recombinación no homóloga entre regiones de cambio. Los resultados de los experimentos de los presentes solicitantes, que se describen a continuación, son indicativos de un modelo de recombinación de región de cambio.

Puede recurrirse a dos tipos de mecanismos de corte y empalme alternativos que no sean de delección para explicar un cambio de isotipo. En primer lugar, es posible que se exprese un solo transcrito que abarque tanto μ como $\gamma 1$ a partir del transgén; este transcrito podría someterse a corte y empalme alternativo en respuesta a citocinas inducidas por exposición al antígeno. Como alternativa, un transcrito estéril inducido por citocina que se inicie cadena arriba de $\gamma 1$ podría cortarse y empalmarse en trans con el transcrito μ . Si cualquiera de estos mecanismos fuera responsable de la expresión de secuencias de $\gamma 1$ humanas, entonces sería de esperar que fueran capaces de aislar hibridomas que expresen tanto μ como $\gamma 1$. Sin embargo, aunque se han explorado varios cientos de hibridomas que expresan μ

humana o $\gamma 1$ humana, no se ha descubierto ninguno de dichos hibridomas productores dobles (μ^+ , $\gamma 1^+$). Esto indica que la expresión de $\gamma 1$ se acompaña de la delección del gen μ .

La delección del gen μ puede estar mediada por recombinación no homóloga entre las regiones de cambio μ y $\gamma 1$ o por recombinación homóloga entre las dos repeticiones directas de 400 pb flanqueantes ($\sigma\mu$ y $\Sigma\mu$) que se incluyen en los transgenes HC1 y HC2. Se ha descrito que la recombinación de delección entre $\sigma\mu$ y $\Sigma\mu$ es responsable del fenotipo IgD⁺, IgM⁻ de algunas células B humanas. Aunque el primer mecanismo, recombinación de cambio no homóloga, debería generar productos de cambio de longitudes variables, el segundo mecanismo, la recombinación $\sigma\mu/\Sigma\mu$, debería generar siempre el mismo producto. Se realizó un análisis de transferencia de Southern de ADN genómico aislado a partir de tres hibridomas (Figura 64A), uno que expresaba μ y dos que expresaban $\gamma 1$. Se descubrieron reorganizaciones genómicas cadena arriba del transgén $\gamma 1$ solo en las dos regiones de cambio $\gamma 1$ (Figura 64B). Además, ninguna de las estructuras observadas es compatible con recombinación homóloga entre $\sigma\mu$ y $\Sigma\mu$. Los resultados concuerdan, por lo tanto, con un modelo de expresión de isotipo de $\gamma 1$ mediado por recombinación no homóloga de delección entre las regiones de cambio μ y $\gamma 1$ codificadas por el transgén.

15 *Cambio en Trans*

Además de $\gamma 1$ humana, se encontró γ de ratón en el suero de ratones de JHD transgénica HC1 y HC2. También se obtuvieron hibridomas que expresaban γ de ratón a partir de estos animales. Debido a que los animales de JHD no transgénica homocigotos no expresan niveles detectables de inmunoglobulina de ratón, la expresión de γ de ratón de los animales de JHD transgénica HC1 y HC2 se atribuye al fenómeno de cambio en trans. Todos los hibridomas transgénicos que se han analizado expresan secuencias de región constante de ratón o humanas, pero no ambas. Por lo tanto, es poco probable que esté implicado un mecanismo de corte y empalme en trans. Se usó amplificación por PCR para aislar clones de ADNc de productos de cambio en trans y se determinó la secuencia de nucleótidos de 10 de los clones resultantes (Figura 65). El oligonucleótido 5' en la amplificación por PCR es específico del transgén codificado VH251 y el oligonucleótido 3' es específico para las secuencias $\gamma 1$, $\gamma 2b$ y $\gamma 3$ de ratón. Se encuentran ejemplos de productos de cambio en trans que incorporan estas tres regiones constantes de ratón.

30 *Mutación somática*

Aproximadamente el 1% de los nucleótidos dentro de las regiones variables de los productos con cambio en trans mostrados en la Figura 7 no están codificados por la línea germinal. Esto se debe presumiblemente a mutación somática. Debido a que la secuencia mutada se ha translocado al locus endógeno, las secuencias que actúan en cis que dirigen estas mutaciones podrían localizarse en cualquier parte 3' del cambio γ de ratón. Sin embargo, como se analiza a continuación, también se observa mutación somática en segmentos VDJ que no han experimentado dichas translocaciones; y este resultado indica que las secuencias necesarias para la mutación somática de cadena pesada se incluyen en el transgén.

Para determinar si las construcciones HC1 y HC2 incluyen suficientes secuencias que actúan en cis para que se produzca la mutación somática en los ratones de JHD transgénica, se aislaron y secuenciaron parcialmente clones de ADNc procedentes de dos líneas transgénicas HC1 independientes y una línea HC2. Se descubrió que algunos de los transcritos $\gamma 1$ de los ratones JHD transgénicos contienen regiones V con mutaciones somáticas amplias. La frecuencia de estos transcritos mutados parece aumentar con inmunizaciones repetidas. Las Figuras 66A y 66B muestran dos conjuntos de secuencias de ADNc: un conjunto procede de un ratón de JHD transgénica HC1 (línea 26) que se inmunizó con una sola inyección de antígeno 5 días antes de que se aislara el ARN; el segundo conjunto procede de un ratón de JHD transgénica HC1 (línea 26) que se hiperinmunizó por inyección del antígeno en tres días diferentes comenzando 5 meses antes de que se aislara el ARN; el segundo conjunto procede de un ratón de JHD transgénica HC1 (línea 26) que se hiperinmunizó por inyección de antígeno tres días diferentes comenzando 5 meses antes de que se aislara el ARN; sólo 2 de las 13 regiones V del ratón del 5º día después de la exposición contienen algún nucleótido codificado que no sea línea germinal. Cada una de estas V contiene solamente un solo cambio de nucleótido, dando una frecuencia de mutación somática global de menos del 0,1% para esta muestra. Por el contrario, ninguna de las 13 secuencias V del animal hiperinmunizado es completamente de línea germinal y la frecuencia de mutación somática global es del 1,6%.

La comparación de transcritos μ y $\gamma 1$ aislados a partir de una sola muestra de tejido demuestra que la frecuencia de mutaciones somáticas es superior en copias de transgén que han experimentado un cambio de clase. Se aislaron y secuenciaron parcialmente 47 clones de ADNc μ y $\gamma 1$ independientes a partir de un ratón de JHD transgénica CH1 de línea 57 hiperinmunizado (Figura 67A y 67B). La mayoría de los clones de ADNc μ no están modificados respecto a la secuencia de línea germinal, mientras que más de la mitad de los clones $\gamma 1$ contienen múltiples nucleótidos no codificados por la línea germinal. Las células que expresan $\gamma 1$ son distintas de las células que expresan μ y, aunque los dos procedimientos no están necesariamente relacionados, el cambio de clase y la mutación somática están teniendo lugar en la misma subpoblación de células B.

Aunque no se encuentra una mutación somática amplia del gen VH251 en ratones transgénicos CH1 no hiperinmunizados, se ha descubierto una mutación somática considerable en los genes VH56p1 y VH51p1 en un ratón transgénico HC2 sin tratamiento previo. Se aisló ARN de bazo y ganglio linfático de un animal transgénico HC2 hembra de 9 semanas de edad no inmunizado. Se amplificaron individualmente transcritos $\gamma 1$ que incorporan cada una de las cuatro regiones V en el transgén HC2 usando cebadores específicos V y $\gamma 1$. Los rendimientos relativos

ES 2 345 580 T3

de cada uno de los productos de PCR específicos eran VH56p1>>VH51p1>VH4.21>VH251. Aunque esta técnica no es estrictamente cuantitativa, puede indicar una propensión en el uso de segmento V en el ratón HC2. La Figura 68 muestra 23 secuencias de ADNc $\gamma 1$ escogidas aleatoriamente derivadas de amplificaciones por PCR usando una mezcla equimolar de los cuatro cebadores específicos de V. De nuevo se observa una propensión hacia VH56p1 (19/23 clones). Además, las secuencias VH56p1 muestran una mutación somática considerable con una frecuencia global del 2,1% dentro del segmento génico V. La inspección de las secuencias de CDR3 pone de manifiesto que aunque 17 de los 19 clones de VH56p1 individuales son únicos, proceden de sólo 7 acontecimientos VDJ diferentes. Por lo tanto, parece ser que se seleccionan células B que expresan VH56p1, quizás por un patógeno endógeno o autoantígenos, en el animal sin tratamiento previo. Puede ser relevante que este mismo gen esté sobre-representado en el repertorio fetal humano.

Resumen

Las secuencias que actúan en cis cadena arriba definen la funcionalidad de las regiones de cambio individuales y son necesarias para el cambio de clase. La observación - de que el cambio de clase dentro del transgén HC1 está en gran medida limitado a células implicadas en una respuesta secundaria y no aparece aleatoriamente por la población de células B completa - sugiere que las secuencias mínimas contenidas en el transgén son suficientes. Debido a que las secuencias γ incluidas en esta construcción comienzan sólo 116 nucleótidos cadena arriba del sitio de inicio del transcrito estéril $\gamma 1$, la región reguladora de cambios es compacta.

Los resultados de los presentes solicitantes demuestran que estos elementos reguladores que actúan en cis importantes están estrechamente relacionados con genes γ individuales o asociados con el potenciador de cadena pesada 3' incluido en los transgenes HC1 y HC2. Debido a que los insertos HC1 y HC2 experimentan cambio de clase autónomo de transgén -- que puede servir como marcador para secuencias que es probable que se hayan mutado somáticamente -- se pudo encontrar fácilmente transcritos hipermutados que no se originasen a partir de translocaciones en el locus endógeno. Se descubrieron transcritos γ mutados somáticamente en tres líneas transgénicas independientes (dos líneas HC1 y una línea HC2). Por lo tanto, es poco probable que las secuencias que flanqueen los sitios de integración del transgén afecten a este proceso; en su lugar, las secuencias transgénicas son suficientes para dirigir la mutación somática.

Ejemplo 36

Este ejemplo describe la generación de hibridomas a partir de ratones homocigotos para un locus de inmunoglobulina endógeno inactivado y que contienen secuencias de transgenes que codifican una cadena pesada de secuencia humana y una cadena ligera de secuencia humana. Los hibridomas descritos secretan anticuerpos monoclonales que comprenden una cadena pesada de secuencia humana y una cadena ligera de secuencia humana y se unen a un antígeno predeterminado expresado en linfocitos T. El ejemplo también demuestra la capacidad de los ratones para generar un anticuerpo de secuencia humana en respuesta a un inmunógeno derivado de ser humano, CD4 humano y la idoneidad de dichos ratones como fuente para generar hibridomas que secreten anticuerpos monoclonales de secuencia humana reactivos con antígenos humanos.

45 *A. Generación de Anticuerpos Monoclonales de Ig Humana Derivados de Ratones Transgénicos HC1 Inmunizados con un Antígeno CD4 Humano*

Se inmunizó un ratón transgénico homocigoto para un locus J_H funcionalmente interrumpido y que albergaba un transgén capaz de reorganizarse para codificar una cadena pesada de secuencia humana y un transgén capaz de reorganizarse para codificar una cadena ligera de secuencia humana. El genotipo del ratón era HC1-26⁺ KC1e-1536⁺ $J_H D^{+/+} J_K D^-$, indicando que era homocigoto para la inactivación de cadena pesada murina y la presencia de copias de línea germinal del transgén de cadena pesada de secuencia humana HC1 y el transgén de cadena ligera de secuencia humana KC1e.

El ratón se inmunizó con una variante de la línea celular EL4 (ATCC) que expresaba una molécula de CD4 híbrida de ratón-humano codificada por un polinucleótido transfectado de forma estable. La molécula de CD4 expresada comprende una secuencia de CD4 sustancialmente similar a la humana. Se introdujeron aproximadamente 5×10^6 células en 100 μ l de PBS acompañadas de 100 μ l de Adyuvante Completo de Freund (CFA) en el ratón por inyección intraperitoneal el Día 0. La inoculación se repitió los días 7, 14, 21, 28, 60 y 77 con extracciones de sangre de ensayo los Días 18, 35 y 67. El bazo se extirpó el Día 81 y se fusionaron aproximadamente $7,2 \times 10^7$ células de bazo con aproximadamente $1,2 \times 10^7$ células compañeras de fusión (línea celular P3x63Ag8.653; ATCC) por métodos convencionales (fusión con PEG) y se cultivaron en medio RPMI 1640 FCS al 15%, glutamina 4 mM, piruvato sódico 1 mM más HAT y PSN. Se realizaron múltiples fusiones.

Se cultivaron hibridomas y se ensayaron los sobrenadantes con ELISA para determinar la unión a una fuente comercial de CD4 de secuencia humana soluble recombinante purificado expresado en células CHO (American Bio-Technologies, Inc. (ABT) y/o CD4 obtenido de NEN-DuPont. La muestra de ABT contenía una molécula de CD4 humano de 55 kD purificado compuesta por los dominios V_1 a V_3 de CD4 humano. El CD4 de secuencia humana

ES 2 345 580 T3

recombinante (producido en células CHO-K1) se adsorbió en la placa de ensayo y se usó para capturar anticuerpo a partir de sobrenadantes de hibridoma, después se evaluaron los anticuerpos capturados para determinar su unión a un panel de anticuerpos que se unen a μ humana, κ humana, γ humana, μ murina o κ murina.

5 Se subclonó un hibridoma a partir de su pocillo de placa de cultivo, denominado 1F2. El anticuerpo 1F2 unido a la preparación de CD4 de ABT era positivo para μ humana y κ humana y era negativo para γ humana, γ de ratón y κ de ratón.

10 B. Generación de Anticuerpos Monoclonales de Ig Humana Derivados de Ratones Transgénicos HC2 Inmunizados con CD4 Humano e IgE Humana

El transgén de cadena pesada, HC2, se muestra en la Figura 56 y se ha descrito anteriormente (véase el Ejemplo 34).

15 El transgén de cadena ligera humana, KCo4, representado en la Figura 56 se genera por la cointegración de dos fragmentos de ADN clonados individualmente en un solo sitio en el genoma de ratón. Los fragmentos comprenden 4 segmentos V_{κ} funcionales, segmentos 5J, el exón C_{κ} y elementos potenciadores tanto intrónico como cadena abajo (véase el Ejemplo 21) (Meyer y Nuberger (1989), EMBO J. 8: 1959-1964; Judde y Max (1992), Mol. Cell Biol. 12: 20 5206-5216). Debido a que los dos fragmentos comparten una secuencia común de 3 kb (véase la Figura 56), pueden integrarse potencialmente en ADN genómico como un transgén de 43 kb contiguo después de la recombinación homóloga entre las secuencias solapantes. Se ha demostrado que dichos acontecimientos de recombinación se producen frecuentemente tras la microinyección de fragmentos de ADN solapantes (Pieper *et al.* (1992), Nucleic Acids Res. 20: 25 1259-1264). El ADN co-inyectado también tiende a cointegrarse en el cigoto y las secuencias contenidas dentro de los fragmentos individualmente clonados se unirían posteriormente por reorganización de ADN durante el desarrollo de células B. La Tabla 11 muestra que los insertos transgénicos de al menos 2 de las líneas transgénicas son funcionales. En este conjunto de 36 clones están representados ejemplos de uniones VJ que incorporan cada uno de los 4 segmentos V codificados por transgén y cada uno de los segmentos 5J.

30 TABLA 11

Línea	V κ 65.5	V κ 65.8	V κ 65.15	V κ 65.3	J κ 1	J κ 2	J κ 3	J κ 4	J κ 5
35 n° 4436	0	11	4	3	14	1	0	2	1
n° 4437	1	3	7	8	5	2	1	7	3

40 El uso de segmentos V y J de cadena ligera humana en ratones transgénicos KCo4. La tabla muestra el número de clones de PCR, amplificados a partir de ADNc derivados de dos líneas transgénicas, que contienen las secuencias kappa humanas indicadas. Se sintetizó ADNc usando ARN de bazo aislado de ratones transgénicos KCo4 individuales (ratón n° 8490, 3 meses, macho, KCo4 línea 4437; ratón n° 8867, 2,5 meses, hembra, KCo4 línea 4436). El ADNc se amplificó por PCR usando un oligonucleótido específico de C_{κ} . 5' TAG AAG GAA TTC AGC AGG CAC ACA ACA GAG GCA GTT CCA 3' (SEC ID N°: 193) y una mezcla 1:3 de los 2 oligonucleótidos específicos de V_{κ} siguientes: 5 AGC TTC TCG AGC TCC TGC TGC TCT GTT TCC CAG GTG CC 3' (SEC ID N°: 194) y 5' CAG CTT CTC GAG CTC CTG CTA CTC TGG CTC (C.A)CA GAT ACC 3' (SEC ID N°: 175). El producto de PCR se digirió con XhoI y EcoRI y se clonó en un vector plasmídico. Se determinaron secuencias de nucleótidos parciales por el método de terminación de cadena didesoxi para 18 clones escogidos aleatoriamente de cada animal. Las secuencias de cada clon se compararon con la secuencia de línea germinal del transgén no reorganizado.

55 Se desarrollaron 23 ratones positivos para el minilocus de cadena ligera y 18 positivos para la cadena pesada a partir de los embriones inyectados. Estos ratones y su progenie se cruzaron con ratones que contenían mutaciones dirigidas en los loci de cadena pesada de ratón endógena (cepa JHD) y cadena ligera κ (cepa JCKD) para obtener ratones que contenían cadena pesada y ligera κ humana en ausencia de loci de cadena pesada y cadena ligera κ de ratón funcional. En estos ratones, la única contribución de la cadena ligera de ratón, si existe, es del locus λ de ratón.

60 La Tabla 12 muestra que se produce mutación somática en las regiones variables de los transcritos de cadena pesada humana codificados por transgén de los ratones transgénicos. Se secuenciaron parcialmente 23 clones de ADNc a partir de un ratón transgénico HC2 para determinar la frecuencia de nucleótidos no codificados por la línea germinal dentro de la región variable. Los datos incluyen solamente la secuencia de codones de segmentos V 17-94 de cada clon y no incluyen las regiones N. Se aisló ARN a partir del bazo y ganglio linfático de ratón 5250 (línea 2550 de HC2 hemicigota, JHD homocigota). Se sintetizó ADNc monocatenario y los transcritos γ se amplificaron por PCR como se describe [referencias]. El ADNc amplificado se clonó en vectores plasmídicos y 23 clones escogidos aleatoriamente se secuenciaron parcialmente mediante el método de terminación de cadena didesoxi. La frecuencia de cambios de nucleótidos introducidos por PCR se estima a partir de la secuencia de la región constante como <0,2%.

ES 2 345 580 T3

TABLA 12

Las Regiones Variables de Transcritos y Humanos en Ratones Transgénicos HC2 que Contienen Nucleótidos no Codificados por la Línea Germinal

5	Segmento VH	Número de clones	Número de nucleótidos no codificados por la línea germinal	Frecuencia de nucleótidos no codificados por la línea germinal (%)
	VH251	0		--
15	VH56P1	10	100	2,1
	VH51P1	1	5	2,0
20	VH14.21	3	0	0,0

Citometría de Flujo

Se analizaron las células teñidas usando un clitómetro de flujo FACScan y el programa informático LYSIS II (Becton Dickinson, San José, CA). Se tiñeron células de bazo con los reactivos siguientes: yoduro de propidio (Molecular Probes, Eugene, OR), anti-Ig κ humana conjugado con ficoeritrina (clon HP6062; Caltag, S. Francisco, CA), anti-Ig κ de ratón conjugado con ficoeritrina (clon X36; Becton Dickinson, San José, CA), anti-Ig λ de ratón conjugado con FITC (clon R26-46; Pharmingen, San Diego, CA), anti-Ig μ de ratón conjugado con FITC (clon R6-60.2; Pharmingen, San Diego, CA), anti-Ig μ humana conjugado con FITC (clon G20-127; Pharmingen, San Diego, CA) y anti-B220 de ratón conjugado con Cy-Chrome (clon RA3-6B2; Pharmingen, San Diego, CA).

Expresión de transgenes de Ig humana

La Figura 69 muestra un análisis de citometría de flujo de células de bazo de ratones KCo4 y HC2 que son homocigotos para las mutaciones tanto JHD como JCKD. El transgén HC2 de secuencia humana rescató el desarrollo de células B en el fondo JHD mutante, restaurando el número relativo de células B220⁺ en el bazo hasta aproximadamente la mitad del número en el animal de tipo silvestre. Estas células B expresaban receptores de inmunoglobulina de superficie celular que usaban cadena pesada codificada por transgén. El transgén KCo4 humano también era funcional y competía con éxito con el locus de cadena ligera λ endógeno intacto. Casi el 95% de las células B esplénicas en ratones mutantes homocigotos JHD/JCKD que contienen ambos transgenes humanos de cadena pesada y ligera (dobles transgénicos) expresaban IgM κ de superficie celular completamente humana.

Se determinaron los niveles de Ig en suero por ELISA realizado de la forma siguiente: μ humana: pocillos de microtitulación recubiertos con MAb de ratón anti-IgM humana (clon CH6, The Binding Site, Birmingham, Reino Unido) y revelados con anticuerpo de conejo conjugado con peroxidasa anti-IgM(fc) humana (N° cat. 309-035-095, Jackson Immuno Research, West Grove, PA). γ humana: pocillos de microtitulación recubiertos con MAb de ratón anti-IgG1 humana (clon HP6069, Calbiochem, La Jolla, CA) y revelados con anticuerpo de cabra conjugado con peroxidasa anti-IgG(fc) humana (N° cat. 109-036-098, Jackson Immuno Research, West Grove, PA). κ humana: pocillos de microtitulación recubiertos con MAb de ratón anti-Ig κ humana (N° cat. 0173, AMAC, Inc. Ig κ (N° cat. A7164, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). γ de ratón: pocillos de microtitulación recubiertos con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (N° cat 115-006-071, Jackson Immuno Research, West Grove, PA). λ de ratón: pocillos de microtitulación recubiertos con MAb de rata anti-Ig λ de ratón (N° cat. 02171D, Pharmingen, San Diego, CA) y revelados con anticuerpo de conejo conjugado con peroxidasa anti-IgM(fc) de ratón (N° cat. 309-035-095, Jackson Immuno Research, West Grove, PA). La peroxidasa unida se detecta por incubación con peróxido de hidrógeno y ácido 2,2'-Azino-bis(3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). El producto de reacción se mide por absorción a 415 nm.

Los ratones dobles transgénicos también expresan anticuerpos totalmente humanos en el suero. La Figura 70 muestra niveles en suero medidos de proteínas de inmunoglobulina para 18 ratones dobles transgénicos individuales, homocigotos para inactivaciones de cadena ligera kappa y pesada endógenas obtenidas a partir de varios animales fundadores transgénicos diferentes. Se descubrieron niveles detectables de μ , γ 1 y κ humana. Se ha demostrado anteriormente que la γ 1 humana expresada es el resultado de un cambio de clase auténtico por recombinación genómica entre las regiones de cambio μ y γ 1 de transgén. Además, se ha descubierto que el cambio de clase intratransgén se acompañaba de mutación somática de las regiones variables de cadena pesada. Además de inmunoglobulinas humanas, también se descubrió γ y X de ratón en el suero. Se espera la presencia de proteína λ de ratón, ya que el locus endógeno está completamente intacto. Se ha mostrado en otra parte que la expresión de λ de ratón es una consecuencia de la recombinación de cambio en trans de segmentos VDJ de transgén en el locus de cadena pesada endógena. Este fenómeno de cambio en trans, que se demostró originariamente para alelos de cadena pesada de tipo silvestre y trans-

ES 2 345 580 T3

genes VDJ reorganizados (Durdik *et al.* (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2346-2350; Gerstein *et al.* (1990), Cell 63:537-548), se produce en el fondo JHD mutante debido a que las regiones constantes de cadena pesada cadena abajo y sus elementos de cambio respectivos están todavía intactos.

5 La concentración en suero de IgM κ humana en el ratón doble transgénico era de aproximadamente 0,1 mg/ml, con una desviación muy pequeña entre animales o entre líneas. Sin embargo, los niveles de γ 1 humana, γ de ratón y λ de ratón varían de 0,1 a 10 microgramos/ml. La variación observada en los niveles de γ entre animales individuales puede ser una consecuencia del hecho de que γ es una región constante inducible. La expresión depende presumiblemente de factores tales como la salud del animal, la exposición a antígenos y posiblemente el tipo de MHC. Los niveles en suero de λ de ratón son el único parámetro que parece estar correlacionado con líneas transgénicas individuales. Los ratones KCo4 de línea 4436 que tienen el menor número de copias del transgén por integración (aproximadamente 1-2 copias) tienen los mayores niveles de λ endógena, mientras que los ratones KCo4 línea 4437 (-10 copias por integración) tienen los menores niveles de λ . Esto concuerda con un modelo en el que la λ endógena se reorganiza después del transgén κ , y en el que no se selecciona el nivel de X en suero, sino que en su lugar es un reflejo del tamaño relativo de la combinación de células B precursoras. Los loci de transgenes que contienen múltiples insertos de cadena ligera pueden tener la oportunidad de experimentar más de un acontecimiento de recombinación V a J, con una mayor probabilidad de que uno de ellos sea funcional. Por lo tanto, las líneas de alto número de copias tendrán una combinación más pequeña de células X potenciales.

20 *Inmunizaciones con CD4 e IgE humana*

Para ensayar la capacidad de las células B transgénicas para participar en una respuesta inmune, se inmunizaron ratones dobles transgénicos con antígenos de proteína humana y se midieron los niveles en suero de inmunoglobulinas específicas de antígeno por ELISA. Los ratones se inmunizaron con 50 μ g de sCD4 recombinante (N^o cat. 013101, American Bio-Technologies Inc., Cambridge, MA) unido covalentemente a perlas de poliestireno (N^o cat. 08226, Polysciences Inc., Warrington, PA) en adyuvante completo de Freund por inyección intraperitoneal. Cada uno de los ratones es homocigoto para interrupciones de los loci μ y κ endógenos y hemicigoto para la línea 2500 de transgén HC2 de cadena pesada humana y la línea 4437 de transgén KCo4 de cadena ligera κ humana.

30 *Métodos*

Se diluyeron muestras de suero en pocillos de microtitulación recubiertos con sCD4 recombinante. Se detectaron anticuerpos humanos con anticuerpos de conejo conjugados con peroxidasa anti-IgM(fc) humana (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) o anticuerpo de cabra conjugado con peroxidasa anti-Ig κ humana (Sigma, St. Louis, MO).

35 La Figura 71A muestra la respuesta primaria de ratones transgénicos inmunizados con CD4 soluble humano recombinante. Los cuatro animales inmunizados muestran una respuesta de IgM humana específica de antígeno a una semana. Los anticuerpos en suero específicos para CD4 comprenden tanto cadena pesada μ humana como cadena ligera κ humana.

40 Para evaluar la capacidad del transgén HC2 para participar en una respuesta secundaria, se hiperinmunizaron los ratones transgénicos por inyección repetida con antígeno y se controló el isotipo de cadena pesada de los anticuerpos inducidos. Se inmunizaron ratones homocigotos para el transgén HC2 de cadena pesada humana y el transgén KCo4 de cadena ligera κ humana con 25 μ g de IgE κ humana (The Binding Site, Birmingham, Reino Unido) en adyuvante completo de Freund el día = 0. Después de eso, los animales se inyectaron con IgE κ en adyuvante incompleto de Freund a intervalos aproximadamente semanales. Se diluyeron muestras de suero 1:10 y se realizaron ELISA específicos de antígeno sobre placas recubiertas con λ de IgE humana.

50 La Figura 71B muestra un curso temporal típico de la respuesta inmune de estos animales: en ratones dobles transgénicos se inyectaron IgE humana en adyuvante completo de Freund seguido de refuerzos semanales de IgE en adyuvantes incompleto de Freund. La respuesta de anticuerpos humanos inicial era IgM κ seguida de la aparición de IgG κ humana específica de antígeno. Los anticuerpos séricos inducidos en estos ratones no mostraban reactividad cruzada con IgM humana o BSA. El desarrollo, con el tiempo, de IgG humana.

55 También se ha ensayado la capacidad del transgén de cadena pesada de experimentar cambio de clase *in vitro*: se purificaron células B esplénicas a partir de animales hemicigotos para el cambio de la misma construcción de cadena pesada (HC2, línea 2500) de IgM humana a IgG1 humana en presencia de LPS e IL-4 de ratón recombinante. Sin embargo, el cambio *in vitro* no tenía lugar en presencia de LPS e IL-2 de ratón recombinante o LPS en solitario.

60 Se descubrieron células que expresaban IgM humana en el bazo, ganglios linfáticos, peritoneo y médula ósea de ratones dobles transgénico/dobles *knockout* (0011). Aunque la cavidad peritoneal contiene el número normal de células B, el número absoluto de células B transgénicas en la médula ósea y el bazo es aproximadamente del 10-50% del normal. La reducción puede ser el resultado de un retardo en el desarrollo de células B dependientes de transgén. Los ratones dobles transgénicos/doble *knockout* (0011) también expresan anticuerpos totalmente humanos en el suero, con niveles significativos de μ , γ 1 y κ humana en estos ratones. La γ 1 humana expresada es el resultado de un cambio de clase auténtico por recombinación genómica entre las regiones de cambio μ y γ 1 del transgén. Además, el cambio de clase intratransgén se acompaña de mutación somática de las regiones variables de cadena pesada codificadas por el transgén. Además de inmunoglobulinas humanas, se encuentran μ de ratón y X de ratón en estos ratones. La expresión

ES 2 345 580 T3

de μ de ratón parece ser el resultado de una recombinación de cambio en trans en la que el gen VDJ del transgén se recombina en el locus de cadena pesada de ratón endógena. El cambio en trans que se observaba originariamente en la bibliografía para alelos de cadena pesada de tipo silvestre y transgenes VDJ reorganizados se produce en el fondo $J_H^{-/-}$ porque las regiones constantes de cadena pesada de ratón y sus elementos de cambio respectivos están todavía intactos.

Para demostrar la capacidad de las células B transgénicas para participar en una respuesta inmune, se inmunizaron los ratones 0011 con antígenos de proteína humana y se controlaron los niveles en suero de inmunoglobulinas específicas de antígeno. La respuesta de anticuerpos humana inicial es IgM, seguida de la expresión de IgG humana específica de antígeno (Figura 71B y Figura 73). El lapso de tiempo antes de la aparición de anticuerpos IgG humanos concuerda con una asociación entre cambio de clase y respuesta secundaria a antígeno.

En un ratón transgénico inmunizado con CD4 humano, la reactividad de IgG humana con el antígeno CD4 era detectable a concentraciones séricas que variaban de 2×10^{-2} a $1,6 \times 10^{-4}$.

Identificación de Hibridomas Anti-CD4 Humano

Un ratón transgénico homocigoto para transgén HC2 de cadena pesada humana y el transgén KCo4 de cadena ligera κ humana se inmunizó con $20 \mu\text{g}$ de CD4 humano recombinante en adyuvante completo de Freund el Día 0. Después de eso, a los animales se les inyectó CD4 en adyuvante incompleto de Freund a intervalos aproximadamente semanales. La Figura 73 muestra una respuesta de anticuerpos humanos contra CD4 humano en suero del ratón transgénico. Las muestras de suero se diluyeron 1:50 y se realizaron ELISA específicos de antígeno sobre placas recubiertas con CD4 humano. Cada línea representa determinaciones de muestra individuales. Los círculos rellenos representan IgM, los cuadrados sin relleno representan IgG.

Se aislaron también líneas celulares de hibridoma a partir de uno de los ratones que respondían a inmunización con CD4 humano. Cinco de los hibridomas clonados secretan anticuerpos IgG κ humana (γ 1 humana/ κ humana) que se unen a CD4 humana recombinante y no presentan reactividad cruzada (según se mide por ELISA) con un panel de otros antígenos glicoproteicos. Se determinaron las velocidades de asociación y disociación del antígeno CD4 humano inmunizante para los anticuerpos monoclonales secretados por dos de los hibridomas IgG κ , 4E4.2 y 2C5.1. Las constantes de unión obtenidas experimentalmente (K_a) eran de aproximadamente $9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ y $8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ para los anticuerpos 4E4.2 y 2C5.1, respectivamente. Estos valores de K_a se incluyen en el intervalo de anticuerpos IgG murinos anti-CD4 humano que se han usado en ensayos clínicos por otros (Chen *et al.* (1993) *Int. Immunol.* 6: 647).

Un ratón de línea N° 7494 (0012; HC1-26+; JHD++; JKD++; KC2-1610++) se inmunizó los días 0, 13, 20, 28, 33 y 47 con CD4 humano y produjo anticuerpos anti-CD4 humano compuestos por κ humana y μ o γ humana.

El día 28, se descubrió que estaban presentes μ y κ humana en el suero. El día 47, la respuesta en suero contra CD4 humano estaba compuesta tanto por μ humana como por γ humana, así como por κ humana. El día 50, los esplenocitos se fusionaron con células de mieloma de ratón P3X63-Ag8.653 y se cultivaron. Cuarenta y cuatro de los 700 pocillos (6,3%) contenían anticuerpos monoclonales γ y/o κ humanos anti-CD4 humano. Se confirmó que tres de estos pocillos contenían anticuerpos monoclonales γ humanos anti-CD4 pero carecían de cadenas κ humanas (expresando presumiblemente X de ratón). Nueve de los pocillos primarios contenían anticuerpos monoclonales IgM κ totalmente humanos anti-CD4 y se seleccionaron para una caracterización adicional. Un hibridoma de este tipo que expresa anticuerpos monoclonales IgM κ totalmente humanos anti-CD4 se denominó 2C11-8.

Se clonaron hibridomas primarios por dilución limitante y se evaluaron para determinar su secreción de anticuerpos monoclonales μ y κ humanos reactivos contra CD4. Cinco de los nueve hibridomas permanecían positivos en el ELISA de CD4. La especificidad de estos anticuerpos monoclonales de IgM κ humana por CD4 humano se demostró por su ausencia de reactividad con otros antígenos incluyendo ovoalbúmina, albúmina de suero bovino, albúmina de suero humano, hemocianina de lapa californiana y antígeno carcinoembrionario. Para determinar si estos anticuerpos monoclonales podían reconocer CD4 en la superficie de células (es decir, CD4 nativo) también se ensayaron sobrenadantes de estos cinco clones para determinar su reactividad con una línea celular T CD4+, Sup TI. Cuatro de los cinco anticuerpos monoclonales IgM κ humanos reaccionaban con estas células CD4+. Para confirmar adicionalmente la especificidad de estos anticuerpos monoclonales IgM κ , se tiñeron linfocitos de sangre periférica (PBL) humana recién aislados con estos anticuerpos. Los sobrenadantes de clones derivados de cuatro de los cinco híbridos primarios se unían solamente a linfocitos CD4+ y no a linfocitos CD8+ (Figura 72).

La Figura 72 muestra la reactividad del anticuerpo monoclonal IgM κ anti-CD4 con PBL humanos. Se incubaron PBL humanos con sobrenadante de cada clon o con un anticuerpo monoclonal de control negativo del mismo isotipo, seguido de un anticuerpo monoclonal anti-CD4 de ratón conjugado con PE (fila superior) o un Ab de ratón anti-CD8 humano conjugado con FITC (fila inferior). Cualquier IgM κ humano unido se detectó con un anticuerpo de ratón anti- μ humana conjugado con FITC o con PE, respectivamente. Se muestran resultados representativos para uno de los clones, 2C11-8 (lado derecho) y para IgM κ de control (lado izquierdo). Como era de esperar, la IgM κ de control negativo no reaccionaba con células T y el anticuerpo de cabra anti- μ humana reaccionaba con aproximadamente el 10% de PBL que presumiblemente eran células B humanas.

ES 2 345 580 T3

Un buen crecimiento y altos niveles de producción de anticuerpo monoclonal IgM κ anti-CD4 son factores importante en la selección de una línea celular de hibridoma clonal para su desarrollo. Los datos de uno de los hibridomas, 2C11-8, muestran que pueden producirse hasta 5 pg/célula/día (Figura 74). Se observaron resultados similares con un segundo clon. Como se observa comúnmente, la producción aumenta espectacularmente a medida que las células entran en crecimiento de fase estacionaria. La Figura 74 muestra el crecimiento de células y la secreción de anticuerpos monoclonales IgM κ humanos anti-CD4 en cultivos a pequeña escala. Se sembraron cultivos repetidos a 2×10^5 células/ml en un volumen total de 2 ml. Cada veinticuatro horas después de eso durante cuatro días, se recogieron los cultivos. Se determinó el crecimiento celular por recuento de células viables y la producción de IgM κ se cuantificó mediante una ELISA para μ humana total (panel superior). La producción por célula por día se calculó dividiendo la cantidad de IgM κ por el número de células (panel inferior).

La Figura 75 muestra un mapeo de epítipo de un anticuerpo monoclonal IgM κ humana anti-CD4. Se usaron experimentos de citometría de flujo de unión competitiva para localizar el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal IgM κ anti-CD4, 2C11-8. Para estos estudios se usaron los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD4, Leu3a y RPA-T4 que se unen a epítopos no solapantes únicos en CD4. La fluorescencia de PE de células CD4+ preincubadas con concentraciones decrecientes de RPA-TA o Leu-3a seguido por la tinción con 2C11-8 se detectó con anticuerpo de cabra anti-IgM humana conjugado con PE. Existía una competición dependiente de la concentración para la unión del anticuerpo monoclonal IgM κ humana anti-CD4 2C11-8 por Leu3a, pero no por RPA-T4 (Figura 75). Por lo tanto, el epítipo reconocido por 2C11-8 era similar o idéntico al reconocido por el anticuerpo monoclonal Leu3a, pero distinto al reconocido por RPA-T4.

En resumen, se han producido varios clones de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales IgM κ humanos que reaccionan específicamente con CD4 humano nativo y pueden usarse para discriminar PBL humanas en subpoblaciones CD4⁺ y CD4⁻. Al menos uno de estos anticuerpos se une a o cerca del epítipo definido por el anticuerpo monoclonal Leu3a. Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra este epítipo inhiben una respuesta a leucocitos mixta (Engleman *et al.*, J. Exp. Med. (1981) 153: 193). Una versión quimérica de anticuerpo monoclonal Leu3a ha demostrado cierta eficacia clínica en pacientes con micosis fungoide (Knox *et al.* (1991) Blood 77: 20).

Se han aislado clones de ADNc de 3 líneas celulares de hibridoma diferentes (2C11.8, 2C5.1 y 4E4.2) y se ha determinado la secuencia de nucleótidos parcial de algunos de los genes de inmunoglobulina expresados en cada una de estas líneas celulares. Para el análisis de secuencia, se aisló el ARN total a partir de aproximadamente 5×10^6 células de hibridoma. Se sintetizó ADNc monocatenario por cebado de transcripción inversa con oligo dT. Una porción de este ADNc monocatenario se usó en reacciones de PCR por duplicado cebadas con una combinación de oligonucleótidos con especificidades por (i) regiones flanqueantes variables de cadena pesada contenidas dentro de los transgenes HC1 o HC2 y un solo oligonucleótido cadena abajo específico para secuencia gamma humana constante, o (ii) regiones flanqueantes variables de cadena ligera contenidas dentro del transgén KC2 o KCo4 y un solo oligonucleótido cadena abajo específico para secuencia kappa humana constante. Los productos de estas reacciones de PCR se digirieron con enzimas de restricción apropiadas, se purificaron en gel y se clonaron independientemente en el vector pNNO3. El ADN se aisló y se realizaron reacciones de secuenciación didesoxi manuales y/o fluorescentes automáticas sobre ADN bicatenario.

Las características de los tres hibridomas, 2C11.8, 2C5.1 y 4E4.2, se proporcionan a continuación en la Tabla 11.

TABLA 13

Uso de región variable humana en hibridomas

Subclón	Especificidad	Isotipo	Vh	Dh	Jh	V κ	J κ
2C11.8	nCD4	IgM κ	251	nd.*	nd.	nd.	nd.
2C5.1	rCD4	IgG κ	251	HQ52	JHS	65.15	JK4
4E4.2	rCD4	IgGκ	251	HQ52	JHS	65.15	JK4
* n.d. no determinado							

El análisis de secuencia de nucleótidos de las secuencias de cadena ligera y pesada expresadas a partir de los dos hibridomas de IgG κ 2C5.1 y 4E4.2 pone de manifiesto que existen clones hermanos derivados de la misma célula B

ES 2 345 580 T3

partir de más de dos fragmentos solapantes por recombinación homóloga de una pluralidad de regiones de homología en extremos distales del conjunto de fragmentos a ensamblar *in vivo*, tal como en una célula ES microinyectada o su progenie clonal. El ejemplo también muestra, entre otras cosas, que linfocitos aislados de los animales transgénicos pueden inducirse para experimentar cambio de isotipo *in vitro*, tal como con IL-4 y LPS.

Se construyó un conjunto de cinco clones plasmídicos diferentes de modo que pudieran aislarse insertos de plásmido, sustancialmente libres de secuencias de vector; y de modo que los insertos formaran conjuntamente un solo conjunto imbricado de secuencias solapantes que abarcan aproximadamente 150 kb de longitud. Este conjunto incluye secuencias codificantes V, D, J, μ , $\gamma 3$ y $\gamma 1$ humanas, así como una secuencia potenciadora 3' de cadena pesada de ratón. Los cinco clones son, en orden 5' a 3': pH3V4D, pCOR1xa, p11-14, pP1-570, y pHP-3a (Figura 76). Se usaron varios vectores de clonación diferentes para generar este conjunto de clones. Algunos de los vectores se diseñaron específicamente con el fin de construir transgenes de gran tamaño. Estos vectores (pGP1a, pGP1b, pGP1c, pGP1d, pGP1f, pGP2a y pGP2b) son plásmidos basados en pBR322 que se mantienen en un menor número de copias por célula que los vectores pUC (Yanisch-Perron *et al.* (1985) *Gene* 33: 103-119). Los vectores también incluyen señales de terminación de la transcripción *trpA* entre el polienlazador y el extremo 3' del gen de β -lactamasa del plásmido. Los polienlazadores están flanqueados por sitios de restricción para la enzima de corte poco frecuente NotI; permitiendo por lo tanto el aislamiento del inserto a partir de secuencias de vector antes de la microinyección en embriones. En el interior de los sitios NotI, los polienlazadores incluyen sitios XhoI y Sall únicos en cualquier extremo. Los vectores pGP1 se describen en Taylor *et al.* (1992) *Nucleic Acids Res.* 23: 6287. Para generar los vectores pGP2, se digirió primero pGP1f con AlwNI y se ligó con los oligonucleótidos sintéticos o-236 y o-237 (o-236, 5' - ggc ggc cct tgg cct aag agg cca - 3' (SEC ID N°: 180); o-237, 5' - cct ctt agg cca agg cgc gcc tgg - 3' (SEC ID N°: 181). El plásmido resultante se denomina pGP2a. Después, el plásmido pGP2a se digirió con KpnI y EcoRI y se ligó con los oligonucleótidos o-288 y o-289 (o-288, 5' - aat tca gta tgc atg tgg tac - 3' (SEC ID N°: 182); o-289, 5' - cac atc gat act g - 3' (SEC ID N°: 183) para generar pGP2b (Figura 77A y Figura 77B).

El esquema general para la construcción de transgén con los plásmidos pGP se resume en la Figura 78 (rutas A y B). Todos los fragmentos de ADN componentes se clonan primero individualmente en la misma orientación 5' a 3' en vectores pGP. Se destruyen sitios NotI, XhoI y Sall de inserto por mutagénesis con oligonucleótidos o, si es posible, por digestión parcial, relleno con polimerasa y ligación de extremo romos. Esto deja sólo los sitios XhoI y Sall procedentes del polienlazador en los extremos 5' y 3' de cada inserto. Después pueden combinarse insertos individuales por etapas mediante el proceso de aislamiento de fragmentos XhoI/Sall a partir de un clon e inserción del fragmento aislado en el sitio XhoI 5' o Sall 3' de otro clon (Figura 78, ruta A). Después se exploran transformantes por hibridación sobre filtro con uno o más fragmentos de inserto para obtener el clon ensamblado. Debido a que las uniones XhoI/Sall no pueden escindirse con ninguna enzima, el producto resultante mantiene sitios XhoI 5' y Sall 3' únicos y puede usarse en la etapa de la construcción. Una variación de este esquema se realiza usando los vectores pGP2a y pGP2b (Figura 78, ruta B). Estos plásmidos incluyen un sitio SfiI entre el gen de resistencia a ampicilina y el origen de replicación del plásmido. Por corte con SfiI y XhoI o Sall, los insertos pueden aislarse juntos con la secuencia a resistencia a fármaco o el origen de replicación. Un fragmento SfiI/XhoI se liga con un fragmento SfiI/Sall en cada etapa de la síntesis. Existen tres ventajas para este esquema: (i) se reducen los transformantes de fondo debido a que son necesarias secuencias de ambos fragmentos para la replicación del plásmido en presencia de ampicilina; (ii) la ligación puede producirse solamente en una sola orientación 5' a 3'; y (iii) los extremos SfiI no son compatibles consigo mismos y no son compatibles con Sall o XhoI, reduciendo de este modo el nivel de ligación no productiva. La desventaja de este esquema es que deben eliminarse los sitios SfiI del inserto así como los sitios NotI, XhoI y Sall. Estos vectores de número medio de copias son una mejora sobre los vectores de clonación derivados de pUC usados comúnmente. Para comparar la capacidad de estos vectores para mantener insertos de ADN de gran tamaño, un fragmento XhoI de 43 kb que comprende la región JH/C μ humana se ligó en el sitio Sall de pSP72 (Promega, Madison, WI), pUC19 (BRL, Grand Island, NY) y pGP1f. Se transfirieron colonias transformantes a nitrocelulosa y los clones que contenían inserto se seleccionaron por hibridación con sonda radiomarcada. Se cultivaron clones positivos durante una noche en 3 ml de medio y se aisló el ADN: la digestión con EcoRI del ADN resultante pone de manifiesto que todos los clones derivados de pSP72 y pUC19 delecionaban el inserto (Figura 79); sin embargo, 12 de los 18 clones derivados de pGP1f contenían insertos intactos. Ambas orientaciones están representadas en estos 12 clones.

La construcción y aislamiento de los cinco clones (pH3V4D, pCOR1xa, p11-14, pP1-570 y pHP-3a) usado para generar el transgén HCo7 se resume a continuación.

pH3V4D

Se aislaron segmentos génicos variables de cadena pesada de configuración de línea germinal a partir de bibliotecas de ADN genómicas de fago 1 usando sondas oligonucleotídicas sintéticas para las clases VH1 y VH3. La sonda de clase VH1 era o-49:

5'- gtt aaa gag gat ttt att cac ccc tgt gtc ctc tcc aca ggt gtc -3' (SEC ID N°:

78)

ES 2 345 580 T3

La sonda de clase VH3 era o-184:

5'- gtt tgc agg tgt cca gtg t(c, g)a ggt gca gct g(g, t)t gga gtc (t, c)(g, c)g-3'
(SEC ID N°: 184)

Se aislaron los clones que hibridaban positivamente, se mapearon parcialmente por restricción, se subclonaron y se secuenciaron parcialmente. A partir de la secuencia de nucleótidos se determinó que uno de los clones VH1 aislado con la sonda o-49 codificaba un segmento génico VH, 49.8, que comprendía una secuencia de aminoácidos idéntica a la contenida en la secuencia publicada del gen hv1263 (Chen *et al.* (1989) *Arthritis Rheum.* 32: 72). Tres de los genes de VH3 184.3, 184.14 y 184.17, que se aislaron con la sonda o-184, contenían secuencias que codificaban secuencias de aminoácidos idénticas a las contenidas en lo publicado para los genes de VH DP-50, DP-54 y DP-45 (Tomlinson *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 227: 776). Estos cuatro genes de VH se usaron para construir el plásmido pH3V4D.

Se descubrió que el gen 184.3 estaba contenido en un fragmento BamHI de 3 kb. Este fragmento se subclonó en el vector plasmídico pGP1f de modo que el sitio XhoI del polienlazador está en posición 5' del gen y el sitio Sall está 3'. El plásmido resultante se denomina p184.3.36f. Se descubrió que el gen 184.14 estaba contenido en un fragmento HindIII de 4,8 kb. Este fragmento se subclonó en el vector plasmídico pUC19 en una orientación tal que el gen podía aislarse adicionalmente como un fragmento de 3,5 kb por digestión con XhoI/Sall en un sitio XhoI genómico 0,7 kb cadena arriba del gen y un sitio Sall derivado de polienlazador en posición 3' del gen. El plásmido resultante se denomina p184.14.1. Se observó que el gen 184.17 estaba contenido en un fragmento HindIII de 5,7 kb. Este fragmento se subclonó en el vector plasmídico pSP72 (Promega, Madison, WI) en una orientación tal que los sitios XhoI y Sall procedentes del polienlazador están, respectivamente, en posición 5' y 3' del gen. El inserto de este plásmido incluye un sitio XhoI en el extremo 3' del gen que se eliminó por digestión parcial con XhoI, rellenado con fragmento de Klenow y religación. El plásmido resultante se denomina p184.17SK. Se descubrió que el gen 49.8 estaba contenido dentro de un fragmento XbaI de 6,3 kb. Este fragmento se subclonó en el vector plasmídico pNNO3, de modo que los sitios XhoI y ClaI procedentes de polienlazador están, respectivamente, en posición 5' y 3' del gen, para generar el plásmido pVH49.8 (Taylor *et al.* (1994) *International Immunol.* 6: 579). El inserto XhoI/ClaI de pVH49.8 se subclonó después en pGP1f para generar el plásmido p49.8f que incluye sitios XhoI y Sall únicos respectivamente en los extremo 5' y 3' del gen 49.8.

El fragmento XhoI/Sall de 3,5 kb de p184.14.1 se clonó en el sitio XhoI de p184.3.36f para generar el plásmido pRMVHI que incluye los genes tanto 184.14 como 184.3 en la misma orientación. Este plásmido se digirió con XhoI y el fragmento XhoI/Sall de 5,7 kb de p184.17SK se insertó para generar el plásmido pRMVH2 que contiene, de 5' a 3', los tres genes de VH 184.17, 184.14 y 184.3, todos en la misma orientación. El plásmido pRMVH2 se cortó después con XhoI y el inserto XhoI/Sall de 6,3 kb de p49.8f se insertó para generar el plásmido pH3VH4 que contiene, de 5' a 3', los cuatro genes de VH 49.8, 184.17, 184.14 y 184.3, todos en la misma orientación.

El inserto XhoI/EcoRV de 10,6 kb del clon de región D humana pDH1 (descrito anteriormente, por ejemplo, en el Ejemplo 12) se clonó en el vector plasmídico pGPe digerido con XhoI/EcoRV para generar el nuevo plásmido pDH1e. Este plásmido se digirió después con EcoRV y se ligó con un fragmento enlazador sintético que contenía un sitio Sall (5'-ccg gtc gac ccg-3'; SEC ID N°: 185). El plásmido resultante, pDH1es, incluye la mayoría del grupo D1 humano dentro de un inserto que puede escindirse con XhoI y Sall, del modo que el sitio XhoI está en el extremo 5' y el sitio Sall está en el extremo 3'. Este inserto se aisló y se clonó en el sitio Sall de pH3VH4 para generar el plásmido pH3VH4D que incluye cuatro segmentos génicos de VH humanos de configuración de línea germinal y 8 segmentos D humanos de configuración de línea germinal, todos en la misma orientación 5' a 3'. El inserto de este clon puede aislarse, sustancialmente sin secuencias de vector, por digestión con NotI.

pCOR1xa

El plásmido pCOR1 (descrito anteriormente) que contiene un inserto XhoI de 32 kb que incluye 9 segmentos D humanos, 6 segmentos J humanos, el potenciador de cadena pesada intrónica J μ , la región de cambio μ y los exones codificantes C μ , se digirió parcialmente con XhoI, se trató con Klenow y se ligó con un enlazador Sall sintético en el mismo para producir el nuevo plásmido pCOR1xa que tiene un sitio XhoI único en el extremo 5' y un sitio Sall único en el extremo 3'. Tanto pCOR1 como pCOR1xa contienen un fragmento potenciador 3' de cadena pesada de rata de 0,6 kb en el extremo 3', que se incluye en el inserto si el plásmido se digiere con NotI en lugar de XhoI o XhoI/Sall.

Se exploró una biblioteca de fago P1 (Genome Systems Inc., St. Louis, Missouri) mediante PCR usando el par de cebadores oligonucleotídicos:

5'- tca caa gcc cag caa cac caa g -3' (SEC ID N°: 186)

5'- aaa agc cag aag acc ctc tcc ctg -3' (SEC ID N°: 187)

ES 2 345 580 T3

Este par de cebadores se diseñó para generar un producto de PCR de 216 pb con un molde de gen γ humano. Se descubrió que uno de los clones P1 identificados contenía los genes tanto $\gamma 3$ como $\gamma 1$ humanos dentro de un inserto de 80 kb. El inserto de este clon que se representaba en la Figura 80 puede aislarse sustancialmente sin secuencias de vector por digestión con NotI y Sall.

p11-14

El mapeo de restricción del clon $\gamma 3/\gamma 1$ humano P1-570 puso de manifiesto un fragmento BamHI de 14 kb próximo al extremo 5' del inserto. Este fragmento de 14 kb se subclonó en el vector plasmídico pGP1f de modo que el sitio Sall procedente de polienlazador está adyacente al extremo 5' del inserto. El plásmido resultante se denomina pB14. Por separado, un fragmento de ADN genómico NdeI/SpeI de 11 kb que abarca el extremo 3' del gen μ humano y el extremo 5' del gen λ humano, procedente del clon de plásmido pJINA (Choi *et al.* (1993) Nature Genetics 4: 117), se subclonó en el sitio Sall de pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA) usando adaptadores oligonucleotídicos sintéticos. Después se aisló el inserto Sall resultante y se clonó en el sitio Sall de pB14 de modo que la orientación relativa 5' a 3' del fragmento μ de pJINA es la misma que la del fragmento γ de p1-570. El clon resultante se denomina p11-14. El inserto de este clon puede aislarse, sustancialmente sin secuencias de vector, por digestión con NotI.

pHP-3a

El potenciador 3' de cadena pesada de ratón (Dariavach *et al.* (1991) Eur. J. Immunol. 21:1499; Lieberson *et al.* (1991) Nucleic Acids Res. 19: 933) se clonó a partir de una biblioteca de fago X de ADN genómico de ratón balb/c. Para obtener una sonda, se usó ADN de timo de ratón balb/c total como molde para una amplificación por PCR usando los dos oligonucleótidos siguientes:

cck76: 5'- caa tag ggg tca tgg acc c -3' (SEC ID N°: 188)

cck77: 5'- tca ttc tgt gca gag ttg gc -3' (SEC ID N°: 189)

El producto de amplificación de 220 pb resultante se clonó usando el Kit TA Cloning™ (Invitrogen, San Diego, CA) y el inserto se usó para explorar la biblioteca de fago de ratón. Un fragmento HindIII de 5,8 kb que hibridaba positivamente de uno de los clones de fago resultantes se subclonó en pGP1f. La orientación del inserto de este subclón, pH3'ENfa, es tal que el sitio XhoI polienlazador está adyacente al extremo 5' del inserto y el sitio Sall adyacente al extremo 3'. El análisis de secuencia de nucleótidos de una porción de este fragmento HindIII confirmaba que contenía el potenciador de cadena pesada 3'. El inserto de pH3'ENfa incluye un sitio XhoI aproximadamente 1,9 kb cadena del sitio EcoRI en el núcleo de la secuencia potenciadora. Este sitio XhoI se eliminó por digestión parcial, rellenado con Klenow y religación para generar el clon pH3'Efx que incluye sitios XhoI y Sall únicos, respectivamente, en los extremos 5' y 3' del inserto.

El extremo 3' del clon $\gamma 3/\gamma 1$ humano P1-570 se subclonó de la forma siguiente: se digirió ADN P1-570 con NotI, se trató con klenow y después se digirió con XhoI; y el fragmento terminal de 13 kb se aisló y se ligó con el vector plasmídico pGP2b que se había digerido con BamHI, tratado con klenow y después digerido con XhoI. El plásmido resultante pPX-3 había perdido el sitio NotI polienlazador adyacente al sitio XhoI polienlazador en el extremo 5' del inserto; sin embargo, el sitio XhoI permanece intacto y el inserto puede aislarse por digestión con NotI y XhoI o Sall y XhoI. El potenciador 3' que contienen el inserto XhoI/Sall de pH3'Efx se aisló y se ligó en el sitio Sall 3' de pPX-3 para generar el plásmido pHP-3a. El fragmento que contiene potenciador dentro del inserto pHP-3a se liga en la orientación opuesta como el extremo 3' del clon P1-570. Por lo tanto, pHP-3a contiene un sitio Sall interno y el inserto se aísla por digestión con XhoI y NotI. Debido a que éste es un elemento potenciador, la orientación 5' a 3' generalmente no es crítica para su función.

HCo7

Para preparar la muestra de ADN de HCo7 para microinyección pronuclear, el ADN de cada uno de los cinco plásmidos descritos anteriormente se digirió con enzimas de restricción y se separó en un gel de agarosa. El clon pH3V4D se cortó con NotI; el pCOR1xa se cortó con NotI; el p11-14 se cortó con NotI; el pP1-570 se cortó con NotI y Sall; y pHP-3a se cortó con NotI y XhoI. Los insertos de ADN se electroeluyeron y se purificaron adicionalmente en un gradiente de CsCl en equilibrio sin EtBr. Los insertos se dializaron en tampón de inyección y se mezclaron de la forma siguiente: 50 microlitros de inserto pH3V4D a 20,4 ng/microlitro; 50 microlitros de inserto pCOR1xa a 20,8 ng/microlitro; 50 microlitros de inserto p11-14 a 15,6 ng/microlitro; 30 microlitros de inserto pP1-570 a 8,8 ng/microlitro; 60 microlitros de inserto pHP-3a a 10,8 ng/microlitro y 1,49 ml de tampón de inyección.

Animales transgénicos HCo7

La mezcla de ADN de HCo7 se microinyectó en los pronúcleos de embriones de medio día de edad y los embriones se transfirieron a los oviductos de hembras pseudogestantes como se describe por Hogan *et al.* (Manipulating the mouse embryo, Cold Spring Harbor laboratories, Cold Spring Harbor NY).

ES 2 345 580 T3

Se aisló ADN de la punta de la cola de 202 animales que se desarrollaron a partir de embriones microinyectados. El análisis de transferencia de Southern de este ADN usando una sonda que comprendía secuencias μ y DH humanas, puso de manifiesto 22 animales fundadores que habían incorporado al menos una porción del transgén HCo7. La Figura 81 muestra un análisis de la expresión de μ humana y $\gamma 1$ humana en el suero de 6 animales G0 que se desarrollaron a partir de embriones microinyectados con ADN de HCo7. Los niveles séricos de proteínas de inmunoglobulina humana se midieron por ELISA como se describe en Lonberg *et al.* (1994) Nature 368: 856. Cuatro de estos seis ratones mostraban pruebas de incorporación del transgén por análisis de transferencia de Southern y tres de estos ratones expresaban proteínas tanto μ humana como $\gamma 1$ humana en su suero. El único ratón transgénico que no expresaba proteínas de inmunoglobulina humanas, según se determinó por análisis de transferencia de Southern, contenía sólo un bajo número de copias del transgén, y es posible que el transgén completo no se incorporase o que este ratón fuera un mosaico genético. Dos de los ratones HCo7 fundadores, N° 11952 y N° 11959, se cruzaron con ratones transgénicos de minilocus de κ humana (línea 4436 de KCo4) que también eran homocigotos para interrupciones de los loci de cadena ligera κ y pesada endógenos (Lonberg *et al.* en la obra citada), para generar ratones que eran homocigotos para las dos interrupciones de locus endógenos y hemocigotos para los dos miniloci humanos introducidos, KCo4 y HCo7. Cinco de estos ratones denominados dobles transgénicos/de doble delección se analizaron para determinar la expresión de IgM humana, IgG1 humana e IgG3 humana. Como control, tres ratones dobles transgénicos/de doble delección HC2/KCo4 se incluyeron en el análisis. Este experimento se presenta en la Figura 82. Los datos de ELISA en esta figura se recogieron como en Lonberg *et al.* (en la obra citada) excepto porque para la detección de IgG3 humana, el anticuerpo de recubrimiento era un mAb específico dirigido contra IgG3 humana (N° cat. 08041, Pharmingen, La Jolla, CA); los otros detalles del ensayo de IgG3 eran idénticos a los publicados para IgG1. Aunque los ratones HC2/KCo4 expresan sólo IgM humana e IgG1 humana, los ratones HCo7/KCo4 también expresan IgG3 humana además de estos dos isotipos. La expresión de $\gamma 3$ y $\gamma 1$ humana en los ratones HCo7 también se ha detectado por amplificación por PCR de ADNc sintetizado a partir de ARN aislado del bazo de un ratón transgénico. La Figura 83 representa productos de amplificación de PCR sintetizados usando ADNc de bazo de tres líneas diferentes de ratones transgénicos: la línea 2550 es una línea transgénica HC2 mientras que las líneas 11959 y 11952 son líneas transgénicas HCo7. Se sintetizó ADNc monocatenario a partir de ARN de bazo como se describe por Taylor *et al.* (1992) Nucleic Acid Res. 20: 6287. El ADNc se amplificó después por PCR usando los dos oligonucleótidos siguientes:

o-382: 5' - gtc cag aat tcg gt(c, g, t) cag ctg gtg (c, g)ag tct gg -3' (SEC ID N°: 190)

o-383: 5'- ggt ttc tcg agg aag agg aag act gac ggt cc -3' (SEC ID N°: 191):

Este par de cebadores dirige la síntesis de productos de PCR que abarcan la región de bisagra de transcritos γ humanos. Debido a las diferencias en las estructuras de las regiones de bisagra $\gamma 1$ y $\gamma 3$ humanas, la amplificación por PCR distingue entre estos dos transcritos. Un molde $\gamma 1$ humano dirigirá la síntesis de un producto de PCR de 752 pb mientras que $\gamma 3$ humana dirige la síntesis de un producto de 893 pb. Aunque sólo el molde $\gamma 1$ humano es detectable en los bazos de HC2 línea 2550 y HCo7 línea 11959, en el bazo de HCo7 línea 11952 son detectables transcritos tanto $\gamma 1$ como $\gamma 3$. Debido a la naturaleza no cuantitativa de este ensayo y debido a diferencias en la expresión de $\gamma 3$ entre animales individuales (mostradas por ELISA en la Figura 82), la incapacidad para observar $\gamma 3$ en el bazo de HCo7 línea 11959 en la Figura 83 no indica que $\gamma 3$ no se exprese en esta línea. También puede inducirse a las células de bazo aisladas de los ratones HCo7/KCo4 para que expresen tanto IgG1 como IgG3 *in vitro* por estimulación con LPS e IL4. Este experimento se muestra en la Figura 84. Células de bazo de un ratón doble transgénico/de doble delección HCo7/KCo4 macho de siete semanas de edad (N° 12496; línea 11959/4436) ensayadas con respecto a la secreción de inmunoglobulinas en respuesta al mitógeno de células B independiente de timo, LPS, en solitario o junto con diversas citocinas. Se enriquecieron esplenocitos para células B por eliminación citotóxica de células T. Las células enriquecidas en células B se sembraron en placas de 24 pocillos a 2×10^6 células por pocillo en 2 ml de FCS al 10% en RPMI-1640. Se añadió LPS a todos los pocillos a 10 microgramos/ml. Se añadió IL-2 a 50 unidades/ml, se añadió IL-4 a 15 ng/ml, se añadió IL-6 a 15 ng/ml y se añadió IFN γ a 100 unidades/ml. Los cultivos se incubaron a 37°C, CO₂ al 5% durante 10 días, y después los sobrenadantes se analizaron con respecto a IgG1 e IgG3 humana por ELISA. Todos los reactivos para el ELISA eran anti-sueros policlonales de Jackson Immunologicals (West Grove, PA), excepto por la captura de anti-IgM humana que era un anticuerpo monoclonal de The Binding Site (Birmingham, Reino Unido).

55 Ejemplo 38

Este ejemplo demuestra la introducción con éxito en un genoma de ratón de segmentos V de cadena ligera humana funcional por coinyección de un minilocus de cadena ligera κ humana y un clon YAC que comprende múltiples segmentos V κ humanos. El ejemplo muestra que los genes de segmento V κ contenidos en el YAC contribuyen al repertorio expresado de cadenas κ humanas en el ratón resultante. El ejemplo demuestra un método para la expansión de repertorio de proteínas inmunoglobulina humana codificadas por transgén y muestra específicamente cómo un repertorio de región variable de cadena κ humana puede expandirse por co-introducción de polinucleótidos no asociados que comprenden segmentos de región variable de inmunoglobulina humana.

65

ES 2 345 580 T3

Introducción de segmentos V de cadena ligera humana funcionales por co-inyección de ADN de clon de cromosoma artificial de levadura que contiene V_k y ADN de clon de minilocus de cadena ligera k

I. Análisis de una cepa de levadura que contiene segmentos génicos de V_k humanos clonados.

Se aisló el ADN genómico total de una cepa de levadura que contenía un cromosoma artificial de levadura de 450 kb (YAC) que comprendía una porción del locus V_k humano (designación de biblioteca de YAC ICRF 4x17E1). Para determinar la identidad de algunos de los segmentos génicos de V_k incluidos en este clon de YAC, el ADN genómico se usó como sustrato para una serie de reacciones de amplificación por PCR específicas de familia V_k. Cuatro cebadores 5' diferentes se emparejaron cada uno con un solo cebador 3' consenso en cuatro conjuntos de amplificaciones. Los cebadores 5' eran o-270 (5'-gac atc cag ctg acc cag tct cc-3'; SEC ID N°: 192), o-271 (5'-gat att cag ctg act cag tct cc-3'; SEC ID N°: 193), o-272 (5'-gaa att cag ctg acg cag tct cc-3'; SEC ID N°: 194), y o-273 (5'-gaa acg cag ctg acg cag tct cc-3'; SEC ID N°: 195). Estos cebadores se usan por Marks *et al.* (Eur. J. Immunol. 1991. 21, 985) como cebadores específicos de la familia V_k. El cebador 3' o-274 (5'-gca agc ttc tgt ccc act gcc act gaa cc-3'; SEC ID N°: 196), se basa en una secuencia consenso para FR3. Cada uno de los cuatro conjuntos de cebadores dirigía la amplificación del fragmento de 0,2 kb esperado a partir del ADN genómico de levadura que contenía el clon de YAC 4x17E. Los 4 conjuntos de productos de amplificación diferentes se purificaron en gel después y se clonaron en el sitio PvuII/HindIII del vector plasmídico pSP72 (Promega). El análisis de secuencia de nucleótidos de los 11 clones resultantes identificó siete genes V distintos. Estos resultados se presentan a continuación en la Tabla 14.

TABLA 14

Identificación de segmentos V_k humanos en el YAC 4x17E1

Cebadores de PCR	clon nº	gen identificado	Familia de V _k
o-270/o-274	1	L22*	I
- " -	4	L22*	I
- " -	7	02* o 012	I
o-271/o-274	11	A10*	VI
- " -	15	A10*	VI
o-272/o-274	20	A4* o A20	I
- " -	21	A11*	III
- " -	22	A11*	III
- " -	23	A11*	III
- " -	25	04* o 014	I
o-273/o-274	36	L16* o L2	III
* Segmentos génicos mapeados dentro del grupo de V _k distal (Cox et al. Eur. J. Immunol. 1994. 24, 827; Pargent et al. Eur. J. Immunol. 1991. 21, 1829; Schable y Zachau Biol. Chem. Hoppe-Seyler 1993. 374, 1001)			

Todas las secuencias amplificadas a partir del clon de YAC se asignan de modo inequívoco a genes de V_k que se mapean en el grupo distal o son compatibles con secuencias génicas distales. Como ninguna de las secuencias podría asignarse inequívocamente a genes de V proximales, parece que el YAC 4x17E1 incluye secuencias de la región de V_k distal. Además, una de las secuencias identificadas, el clon nº 7 (Vk02), se localiza cerca del extremo J proximal del grupo distal, mientras que otra secuencia, los clones nº 1 y 4 (VkL22), se localiza más de 300 kb cadena arriba, cerca del extremo J distal del grupo distal. Por lo tanto, si el clon de YAC de 450 kb 4x17E1 representa una copia no delecionada del fragmento génico humano correspondiente, comprende al menos 32 segmentos de V_k diferentes. Sin embargo, algunos de éstos son pseudogenes no funcionales.

2. Generación de ratones transgénicos que contienen segmentos génicos de V_{κ} derivados de YAC

Para obtener ADN de YAC purificado para microinyección en pronúcleos de embriones, el ADN genómico total se fraccionó por tamaño en geles de agarosa. Las células de levadura que contenían el YAC 4x17E1 se incluyeron en agarosa antes de la lisis y el ADN de YAC se separó del ADN cromosómico de levadura por electroforesis en gel de campo pulsado convencional (de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes: celda de electroforesis en gel CHEF DR-II, BIO-RAD Laboratories, Richmond CA). Se tiñeron seis geles de campo pulsado individuales con bromuro de etidio y el material de gel que contenía el clon de YAC se cortó del resto del gel. Los cortes de gel que contenían YAC se incluyeron después en un nuevo molde de gel de agarosa (baja temperatura de fusión) en una bandeja de gel triangular. El gel triangular resultante se prolongaba en el vértice con un gel estrecho que contenía dos moles/litro de acetato sódico además del tampón de gel convencional (Figura 85).

Después, el gel se puso en una cámara de electroforesis sumergida en tampón de gel convencional. La sustancia formadora de gel en forma de "Y" se eleva por encima de la superficie del tampón de modo que la corriente puede fluir solamente hacia el corte de gel de alto contenido en sales estrecho. Se puso un bloque de plexiglás sobre el corte de gel de alto contenido en sales para evitar la difusión del NaOAc en el tampón de gel. El ADN de YAC se sometió después a electroforesis para sacarlo de los cortes de gel originales e introducirlo en el bloque de alto contenido en sales estrecho. En el punto de transición del gel de bajo contenido en sales al gel de alto contenido en sales, existe una caída de la resistencia que detiene eficazmente la migración del ADN de YAC a través del gel. Esto conduce a una concentración del ADN de YAC en el vértice del gel triangular. Después de la electroforesis y la tinción, el ADN de YAC concentrado se retiró por corte del resto del ADN y la agarosa se digirió con GELase (EPICENTRE Technologies). Después se añadió cloruro de cesio al líquido que contenía ADN de YAC para obtener una densidad de 1,68 g/ml. Esta solución se centrifugó a 37.000 rpm durante 36 h para separar el ADN del material contaminante. Se aislaron fracciones de 0,5 ml del gradiente de densidad resultante y la fracción que contenía ADN máximo se dializó contra tris 5 mM (pH 7,4)/NaCl 5 mM/EDTA 0,1 mM. Después de la diálisis, se observó que la concentración de la solución de 0,65 ml resultante de ADN de YAC era de 2 microgramos/ml. Este ADN se mezcló con inserto de ADN purificado de plásmidos pKCIB y pKV4 (Lonberg *et al.* 1994. Nature 368, 856) a una proporción de 20: 1: 1 (microgramos de YAC4x17E1: KC1B: KV4). La solución de 2 microgramos/ml resultante se inyectó en los pronúcleos de embriones de ratón de medio día y 95 embriones microinyectados supervivientes se transfirieron a los oviductos de hembras pseudogestantes. Nacieron 39 ratones que se desarrollaron a partir de los embriones microinyectados. Dos de estos ratones, el n° 9269 y el n° 9272 se usaron para establecer líneas transgénicas. Las líneas se denominaron KCo5-9269 y KCo5-9272.

Se realizó un análisis de transferencia de Southern de ADN genómico de ratones de las líneas KCo5-9269 y KCo5-9272 para determinar si los segmentos de V_{κ} derivados de YAC 4x17E1 se habían incorporado en sus genomas. Un segmento génico de V_{κ} V κ A10, (n° de acceso x12683; Straubinger *et al.* 1988. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369, 601-607) de la mitad del grupo de V_{κ} distal se seleccionó como sonda para el análisis de transferencia de Southern. Para obtener la sonda clonada, el gen de V κ A10 se amplificó primero por PCR. Los dos oligonucleótidos o-337 (5'- cgg tta aca tag ccc tgg gac gag ac -3'; SEC ID N°: 197) y o-338 (5'-ggg tta act cat tgc ctc caa agc ac-3'; SEC ID N°: 198) se usaron como cebadores para amplificar un fragmento de 1 kb de YAC 4x17E1. El producto de amplificación se purificó en gel, se digirió con HincII y se clonó en pUC18 para obtener el plásmido p17E1A10. El inserto de este plásmido se usó después para sondar una transferencia de southern de ADN de KCo5-9269 y KCo5-9272. La transferencia mostraba hibridación de la sonda con los fragmentos de restricción esperados en el ADN de ratón KCo5-9272 solamente. Esto indica que el gen V κ A10 se incorpora en el genoma de ratones KCo5-9272 y no de ratones KCo5-9269. La línea de ratones KCo5-9272 se cruzó después con ratones HC2-2550/JHD/JKD para obtener ratones homocigotos para las interrupciones de los loci de cadena ligera κ y pesada endógenos y hemi- u homocigotos para los transgenes HC2 y KCo5. Los animales que son homocigotos para interrupciones de los loci de cadena ligera κ y pesada endógena y hemi- u homocigotos para transgenes de cadena ligera κ y pesada humana se denominan ratones dobles transgénicos/de doble delección.

Se realizó un experimento de clonación de ADNc para determinar si cualquiera de los genes de V_{κ} derivados de YAC se expresaba en ratones de la línea KCo5-9272. El ratón doble transgénico/de doble delección n° 12648 (HC2-2550/KCo5-9272/JHD/JKD) se sacrificó y se aisló el ARN total a partir del bazo. Se sintetizó ADNc monocatenario a partir del ARN y se usó como molde en cuatro reacciones de PCR separadas usando los oligonucleótidos o-270, o-271, o-272 y o-273 como cebadores 5' y el oligonucleótido específico de C κ o-186 (5'- tag aag gaa ttc agc agg cac aca aca gag gca gtt cca -3'; SEC ID N°: 173), como cebador 3'. Los productos de amplificación se clonaron en el vector de clonación pCRII TA (Invitrogen). Se determinó la secuencia de nucleótidos de 19 insertos. Los resultados del análisis de secuencia se resumen en la Tabla 15 a continuación.

ES 2 345 580 T3

TABLA 15

Identificación de genes de Vk humanos expresados en la línea de ratón KCo5-9272

Cebadores de PCR	clone nº	Gen identificado	Familia de Vk
o-270/o-186	1	L15*	I
- " -	3	L18**	I
- " -	7	L24**	I
- " -	9	L15*	I
- " -	10	L15*	I
o-271/o-186	15	A10**	VI
- " -	17	A10**	VI
- " -	18	A10**	VI
- " -	19	A10**	VI
- " -	21	A10**	VI
o-272/o-186	101	A27*	III
- " -	102	L15*	I
- " -	103	A27*	III
- " -	104	A27*	III
o-273/o-186	35	A27*	III
- " -	38	A27*	III
- " -	44	A27*	III
- ..-	45	A27*	III
- " -	48	A27*	III
* Genes de Vk codificados por secuencias de plásmido de transgén.			
** Genes de Vk codificados únicamente por secuencias de transgén derivadas de YAC.			

Estos resultados muestran que al menos 3 de los segmentos génicos de V_k derivados de YAC A10, L18 y L24 contribuyen al repertorio humano expresado de los ratones de la línea KCo5-9272.

Para determinar el efecto de este repertorio aumentado sobre el tamaño de las diversas poblaciones celulares B220⁺ en médula ósea y bazo, se realizó un análisis citométrico de flujo en ratones de línea KCo5-9272. Parte de este análisis se muestra en las Figuras 86 y 67. En este experimento se comparan dos ratones dobles transgénicos/de doble delección, conteniendo uno el transgén KCo5 y conteniendo el otro el transgén KCo4. Estos dos transgenes comparten las mismas secuencias de región constante y de unión, así como las mismas secuencias intrónicas y potenciador 3'. También comparten cuatro segmentos génicos de V clonados diferentes; sin embargo, el transgén KCo5 incluye los segmentos de V adicionales derivados de YAC 4x17E1 que no se incluyen en el transgén KCo4. Se aislaron células a partir del ratón nº 13534 (HC2-2550/KCo5-9272/JHD/JKD) y el ratón nº 13449 (HC2-2550/KCo4-4436/JHD/JKD). Se tiñeron células de médula ósea con anti-B220 de ratón (Caltag, South San Francisco, CA), anti-CD43 de ratón (Pharmingen, La Jolla, CA) y anti-IgM humana (Jackson Immunologic, West Grove, PA). Se tiñeron células de bazo con anti-B220 de ratón y anti-IgM humana.

La Figura 86 muestra una comparación de las poblaciones de células B y de poblaciones progenitoras de células B en la médula ósea de ratones KCo5 y KCo4. La fracción de células B en la médula ósea (B220⁺, IgM⁺) es apro-

ximadamente tres veces superior en los ratones KCo5 (6%) de lo que lo es en ratones KCo4 (2%). La población de células pre-B (B220⁺, CD43⁻, IgM⁻) también es superior en los ratones KCo5 (el 9%, en comparación con el 5% para KCo4). Además, el compartimento pro-B (B220⁺, CD43⁺) está elevado en estos ratones (el 11% para KCo5 y el 5% para KCo4). Aunque cada uno de estos tres compartimentos es superior en los ratones KCo5 de lo que lo es en los ratones KCo4, los niveles son todavía aproximadamente la mitad de los encontrados en ratones de tipo silvestre. El aumento en el número de células B de médula ósea es presumiblemente una consecuencia directa del mayor tamaño de repertorio. El mayor repertorio primario de estos ratones puede proporcionar Ig de membrana con alguna afinidad umbral mínima para antígenos endógenos. La unión al receptor podría permitir después la proliferación de las células B que expresan la Ig reactiva. Sin embargo, debido a que las células pre-B y pro-B no expresan genes de cadena ligera, la explicación para los mayores tamaños de estos dos compartimentos en los ratones KCo5 no es inmediatamente evidente. Los compartimentos progenitores de células B pueden ser de mayor tamaño en ratones KCo5 debido a que el mayor número de células B genera un entorno de médula ósea que es más conducente a la expansión de estas poblaciones. Este efecto podría estar mediado directamente por factores secretados o por contactos célula-célula entre células B y células progenitoras o podría estar mediado indirectamente por titulación de factores o células que de otro modo inhibirían la supervivencia o la proliferación de las células progenitoras.

La Figura 87 muestra una comparación de las poblaciones de células B esplénicas (B220⁺, IgM⁺) en ratones KCo5 y KCo4. La diferencia principal entre estos dos ratones son los tamaños relativos de poblaciones de células B B220^{mate} (6% en los ratones KCo5 y 13% en los ratones KCo4). Las células B220^{mate} son mayores que las células B B220^{brillante} y una mayor fracción de las mismas expresa la cadena ligera 1. Éstas son características de la denominada población B1 que normalmente domina la población de células B peritoneales en ratones de tipo silvestre. Los bazos de los ratones KCo4 comprenden una fracción anómalamente elevada de células de B220^{mate}, mientras que los ratones KCo5 tienen una distribución más normal de estas células. Sin embargo, ambas cepas contienen aproximadamente de una mitad a un tercio del número normal de células B en el bazo.

Ejemplo 39

Este ejemplo demuestra el uso con éxito de ratones transgénicos KCo5 del Ejemplo 38 para aislar clones de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales IgG humanos específicos de antígeno de alta afinidad.

Inmunización. Se inmunizó por vía intraperitoneal cada dos semanas durante ocho semanas un ratón de doble delección/doble transgénico (KCo5-9272/Hc2-2550/JHD/JKD, n° 12657) con 4 a 10 x 10⁶ células T4D3 irradiadas, una línea de células T murinas que expresa CD4 humano (Dr. Jane Parnes, Stanford University) seguido de una inyección intraperitoneal dos semanas después de 20 mg de CD4 humano recombinante soluble (sCD4; Intracell) en adyuvante incompleto de Freund (Sigma). Los ratones se reforzaron una vez 3 días antes de la fusión con 20 mg de sCD4 por vía intravenosa.

Fusión de hibridoma. Se fusionaron suspensiones de una sola célula de linfocitos esplénicos procedentes del ratón inmunizado con un sexto del número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580) con PEG al 50% (Sigma). Las células se sembraron a aproximadamente 2 x 10⁵ en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contenía Suero de Clon Fetal al 20% (HyClone), medio acondicionado "653" al 18%, Origen al 5% (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, penicilina 50 unidades/ml mM, estreptomycin 50 mg/ml, gentamicina 50 mg/ml mM y HAT 1X (Sigma; el HAT se añadió 24 después de la fusión). Después de dos semanas, las células se cultivaron en medio en el que el HAT se sustituyó con HT. Los pocillos se exploraron mediante ELISA y citometría de flujo una vez que se observaba un crecimiento de hibridoma considerable o medio gastado.

Exploración de hibridoma mediante ELISA. Para detectar mAb anti-CD4, se recubrieron placas de microtitulación (Falcon) durante una noche a 4°C con 50 ml de 2,5 mg/ml de sCD4 en PBS, se bloquearon a TA durante 1 h con 100 ml de suero de pollo al 5% en PBS y después se incubaron secuencialmente a TA durante 1 h cada una con diluciones 1:4 de sobrenadante de hibridomas, dilución 1:1000 de fragmentos F(ab')₂ de anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRPO) (Jackson) o dilución 1:250 de anticuerpo de cabra anti-IgK humana conjugado con HRPO (Sigma) más suero de ratón normal al 1% y, por último, con ABTS 0,22 mg/ml en tampón citrato y fosfato 0,1 M, pH 4 con H₂O₂ al 0,0024%. Las placas se lavaron 3-6 veces con tampón de lavado (Tween-20 al 0,5% en PBS) entre todas las incubaciones excepto la primera. Se usó diluyente (tampón de lavado con suero de pollo al 5%) para diluir los sobrenadantes y los conjugados con HRPO. Se midió la absorbancia usando longitudes de onda dobles (la DO a la longitud de onda de referencia de 490 nm se restó de la DO a 415 nm).

Para detectar mAb que contenían λ de ratón se usó el protocolo de ELISA anterior con las excepciones siguientes. Se recubrieron pocillos de placas de microtitulación con 100 ml de 1) anticuerpo de cabra anti- λ de ratón (Pierce) 1,25 mg/ml, 2) anticuerpo de cabra anti-Fc γ humano (Jackson) 1,25 mg/ml o 3) sCD4 (ABT) 2,5 mg/ml. Para la etapa de detección, se usaron 100 ml de anticuerpo de cabra anti-ratón 1 (SBA) conjugado con biotina 1:5000 seguido de 100 ml de estreptavidina conjugada con HRPO (Jackson) 1:1000. Se usaron patrones de mAb murinos y humanos a las concentraciones indicadas. Para buscar reactividad cruzada con antígenos no relacionados, se recubrieron los pocillos con CEA (Crystal Chem), KLH (CalBiochem), HSA (Sigma), BSA (Sigma), OVA (Sigma; todos a 2 mg/ml, excepto el CEA que era a 2,5). Los anticuerpos apropiados se titularon y se usaron como controles positivos (IgM humana anti-CEA (GenPharm), de conejo anti-KLH (Sigma), de oveja anti-HSA (The Binding Site), de oveja anti-BSA (The Bin-

ES 2 345 580 T3

ding Site) y de oveja anti-OVA (The Binding Site)). Cualquier anticuerpo unido se detectó con conjugados con HRPO de cabra anti-IgM humana, burro anti-IgG de conejo o burro anti-IgG de oveja (todos diluidos 1:1000 y obtenidos de Jackson). De otro modo, se siguió el protocolo de ELISA convencional.

5 *Exploración de hibridoma por ensayo de citometría de flujo.* Para explorar adicionalmente en busca de mAb reactivos con CD4 de superficie celular nativo, se incubaron 5×10^5 células SupT1 (ATCC CRL 1942) en hielo con una dilución 1:2 de sobrenadante gastado de las placas de fusión durante 30 min, se lavaron dos veces con tampón de tinción frío (BSA al 0,1%, NaN_3 al 0,02% en PBS), se incubaron con 1,5 mg/ml de un fragmento F(ab')_2 de anticuerpo de cabra anti-Fcg humano conjugado con FITC (FITC-GaHuIgG; Jackson) durante 15 min, se lavaron una vez y se
10 analizaron inmediatamente en un FACScan (Becton-Dickinson).

Hibridomas reactivos con CD4. Usando las técnicas de ELISA y citometría de flujo descritas anteriormente, se identificaron 12 clones de hibridoma que secretaban IgG humana específicamente reactiva con CD4 humano nativo. Diez de estos doce clones se subclonaron adicionalmente. Ocho de estos subclones se identificaron como hibridomas
15 secretores de IgG1 κ humana. Los otros dos expresaban una cadena ligera X de ratón. Los pocillos parentales para los 8 clones totalmente humanos eran: 1E11, 2E4, 4D1, 6C1, 6G5, 7G2, 10C5 y 1G1. Los ensayos citométricos de flujo de la unión de 3 de los subclones de IgG κ totalmente humanos (4D1.4, 6G5.1 y 10C5.6) se muestran en la Figura 88.

La Figura 88 muestra la unión de anticuerpos monoclonales IgG κ anti-nCD4 a células SupT1 CD4+. Las células de cultivos en crecimiento en fase logarítmica se lavaron y se tiñeron sin anticuerpo monoclonal, 4E4.2 (como control negativo), Leu3a quimérico (como control positivo) o con uno de los 10 anticuerpos monoclonales IgG humana anti-nCD4. Cualquier anticuerpo monoclonal unido se detectó con anticuerpo de cabra anti-Fcg humano conjugado con FITC. Los diez anticuerpos monoclonales se unían a células SupT1 aunque sólo se muestran datos en la presente memoria para tres de ellos.
20

Análisis de secreción de anticuerpo humano por hibridomas clonados. Para comparar los niveles de crecimiento y secreción de mAb, los subclones se pusieron en cultivos repetidos en medio HT en placas de 24 pocillos a una densidad inicial de 2×10^5 células/ml. Cada día durante 7 días, se recogió uno de los cultivos repetidos para cada subclón y se determinó el número de células, la viabilidad celular (mediante exclusión con Azul tripán) y la cantidad de mAb en el sobrenadante (mediante un ELISA cuantitativo para γ humana total). La Tabla 16 muestra los datos para la secreción de anticuerpos por 7 de los subclones de hibridoma.
25

TABLA 16

Niveles de Secreción para Anticuerpos Monoclonales IgG κ Anti-nCD4

Subclón	pg/célula	pg/célula/día
1E11.15	3,9	0,56
1G1.9	11	1,5
4D1.4	1,4	0,91
6C1.10	3,3	0,48
6G5.1	7,8	1,1
7G2.2	4,4	0,63
10C5.6	8,0	1,1

* $\text{pg/célula} = (\text{cantidad máxima de mAb})/(\text{número máximo de células viables})$
 $\text{pg/célula/día} = (\text{pg/célula})/7$
días

60 *Purificación de mAb humanos.* Los clones de hibridoma individuales se cultivaron en medio sin HT y Origen y el FCS se disminuyó gradualmente hasta aproximadamente el 2-3% en los 11 cultivos finales. Se recogieron los sobrenadantes una vez que la viabilidad de los hibridomas había disminuido por debajo de aproximadamente el 30%. Para purificar los mAb IgG κ , los sobrenadantes gastados se centrifugaron para eliminar las células, se concentraron por ultrafiltración hasta aproximadamente 50 a 100 ml, se diluyeron 1:5 con PBS, pH 7,4, y se cargaron en una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia). Después de lavar con 3-5 volúmenes de columna de PBS, los mAb IgG κ humanos se eluyeron con HCl 0,1, NaCl 150 mM, pH 2,8 y se neutralizaron inmediatamente con base Tris 1 M. Se combinaron fracciones de columna que contenían material con una $\text{DO}_{280} > 0,2$ y se dializaron en PBS. La DO_{280} se determinó
65

ES 2 345 580 T3

después y se usó un coeficiente de absorptividad de 1,4 para calcular la concentración de proteína de la IgG humana. No se detectaron mAb en el flujo y el % de recuperaciones variaba del 93 al 100%. Se obtuvieron de tres a seis mg de cada mAb purificado con una pureza de >90%.

5 *Análisis de anticuerpos monoclonales de hibridomas clonados*

Para investigar la especificidad de unión de los mAb, se aislaron PBMC humanos sobre Ficoll y se tiñeron de la forma siguiente. Se incubaron PBMC humanas (10^6) en tampón de tinción durante 30 min en hielo, en reacciones separadas, con volúmenes equivalentes de sobrenadante de cada uno de tres de los hibridomas subclonados (4D1.4, 6G5.1 y 10C5.6) o con un mAb de control negativo del mismo isotipo, se lavaron dos veces y se incubaron 20 min en hielo con 1 mg/ml de FITC-GaHuIgG junto con 10 ml de mAb de ratón anti-CD4 humano (Leu3a; Becton-Dickinson) conjugado con ficoeritrina (PE), 10 ml de mAb de ratón anti-CD8 humano (Leu2a; Becton-Dickinson) conjugado con PE o 5 ml de mAb de ratón anti-CD19 humano (SJ25-C1; Caltag) conjugado con PE. Los linfocitos seleccionados se analizaron después en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San José, CA). Se descubrió que los tres anticuerpos se unían específicamente a la fracción CD4 de las PBMC humanas.

Para aproximarse a la localización del epítipo reconocido por estos tres mAb, se preincubaron 5×10^5 células SupT1 durante 20 min en hielo con tampón, RPA-Te4 2,5 mg/ml o Leu3a 2,5 mg/ml en tampón de tinción, después durante 30 min con uno de los 10 mAb de IgG (en sobrenadante diluido 1:2) y finalmente con anticuerpo de cabra anti-Fcy humano conjugado con FITC 0,5 ml/mg para detectar cualquier IgG humana unida. Las células se lavaron dos veces con tampón de tinción antes y una vez después de la última etapa. Los resultados de este ensayo de bloqueo se muestran en la Figura 89. Ninguno de los tres anticuerpos comparte un epítipo con RPA-T4, mientras que 6G5.1 y 10C5.6 parecen reconocer el mismo epítipo (o uno adyacente) al reconocido por Leu3a.

25 *Determinaciones de las constantes de velocidad y equilibrio*

Se inmovilizó sCD4 (de 2500 a 4200 RU) por acoplamiento covalente por medio de grupos amina con la superficie de microplaca detectora de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se hicieron flujos diluciones de anticuerpos sobre las microplacas detectoras acopladas con antígeno hasta que se alcanzó el equilibrio y después se dejó que fluyera solamente tampón. Para cada fase de la reacción, unión y disociación, se representó la fracción de anticuerpo unido a lo largo del tiempo. La derivada de la curva de unión (dR/dt) se calculó y se representó frente a la respuesta para cada concentración. Para calcular la constante de velocidad de asociación (k_{asoc}), las pendientes de las líneas resultantes se representaron después frente a la concentración del anticuerpo monoclonal. La pendiente de la línea de esta gráfica se correspondía con la k_{asoc} . La constante de velocidad de disociación (k_{disoc}) se calculó a partir del logaritmo de la disminución de respuesta (durante la fase de flujo de tampón) frente al intervalo de tiempo. La K_a se obtenía por división de la k_{asoc} por la k_{disoc} . Los datos de constante de afinidad y velocidad medidos para 5 anticuerpos monoclonales purificados diferentes obtenidos a partir de los ratones doble transgénicos/de doble delección KCo5/HC2 y un anticuerpo purificado obtenido a partir de una fuente comercial (Becton Dickinson, San José, CA) se presentan en la Tabla 17.

TABLA 17

Constantes de velocidad y avidez para anticuerpos monoclonales que se unen a CD4 humano

45

Hibridoma	Anticuerpo	Fuente	$k_{as}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{dis}(s^{-1})$	$K_a(M^{-1})$
1E11.15	IgG1k humana	transgénico HC2/KCo5	$2,7 \times 10^5$	$4,6 \times 10^{-5}$	$5,8 \times 10^9$
1G1.9	IgG1k humana	transgénico HC2/kCo5	$9,1 \times 10^4$	$2,2 \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^9$
4D1.4	IgG1k humana	transgénico HC2/KCo5	$9,8 \times 10^4$	$4,2 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^9$
6G5.1	IgG1k humana	transgénico HC2/KCo5	$1,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{10}$
10C5.6	IgG1k humana	transgénico HC2/KCo5	$7,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^9$
Leu3a	IgG1k de ratón	Becton Dickinson	$1,5 \times 10^5$	$4,2 \times 10^{-5}$	$3,7 \times 10^{10}$

50

55

60 *Reacción de linfocitos mixtos (MLR).* Para comparar la eficacia *in vitro* del anticuerpo monoclonal humano 10C5.6 obtenido a partir del ratón transgénico KCo5 con la del anticuerpo de ratón Leu3a, se realizó un ensayo de MLR. Se aislaron PBMC humanas de 2 donantes no relacionados sobre Ficoll y se purificaron PBL CD4+ de cada donante usando una columna de CD4 (Human CD4 Collect, Biotex Laboratories, Inc., Canadá) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se obtuvieron células estimulantes inactivadas por tratamiento de PBMC de ambos donantes con mitomicina C 100 mg/ml (Aldrich) en medio de cultivo (RPMI 1640 con suero AB humano inactivado por calor al 10% (de NABI), Hepes, piruvato sódico, glutamina, pen/estrep y b-mercaptoetanol (todos usados a las concentraciones recomendadas por el fabricante)) durante 30 min a 37°C seguido de 3 lavados con medio de cultivo. Se filtraron de forma estéril concentraciones variables de mAb diluidos en medio de cultivo o medio de cultivo solamente y se

65

ES 2 345 580 T3

añadieron a 100 ml por pocillo por triplicado en una placa de fondo redondeado de 96 pocillos. Después se añadieron a cada pocillo 50 ml de 10^5 PBL CD4+ de un donante en medio de cultivo y 10^5 PBMC tratadas con mitomicina C del otro donante en 50 ml de medio de cultivo. Se prepararon placas de control con células de respuesta de PBL CD4+ en solitario más mAb para controlar cualquier efecto tóxico o mitógeno de los mAb. También se incluyeron un control con solo estimulante y un control de fondo de medio. Después de siete días en una incubadora humidificada con CO_2 al 5% a 37°C , se retiraron 100 ml de sobrenadante de cada pocillo y se añadieron 20 ml de reactivo colorimétrico (Cell Titer 96AQ kit, Promega Corporation, Madison, WI). Se permitió que se desarrollara el color durante 4 a 6 h y las placas se leyeron a 490 nm. Los resultados de este experimento, representados en la Figura 90, muestran que el anticuerpo IgG1k humano 10C5.6 es al menos tan eficaz como Leu3a en el bloqueo de la función de células CD4 de PBMC humana en este ensayo.

Ejemplo 40

15 Características de Unión de Anticuerpos Monoclonales IgGkappa Humanos Anti-CD4

Este ejemplo proporciona las características de unión de anticuerpos monoclonales IgGk humanos derivados de clones de hibridoma obtenidos a partir de ratones transgénicos HC2/KCo5/JHD/JCKD inmunizados con CD4 humano. Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales tienen una alta avidéz y afinidad por CD4 humano natural y recombinante.

Se obtuvieron células de 10 líneas celulares de hibridoma individuales (1E11, 1G2, 6G5, 10C5, 1G1, 6C1, 2E4, 7G2, 1F8 y 4D1) que secretan anticuerpos monoclonales IgG kappa humana (mAb) reactivos con CD4 humano, a partir de ratones transgénicos JHD/JCKD/HC2/KCo5. Las líneas celulares se cultivaron en cultivo y se aislaron proteínas de anticuerpo a partir del sobrenadante (Fishwild, *et al.* 1996, Nature Biotechnology 14, 845-851, que se incorpora en la presente memoria como referencia). Se usaron anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad con Proteína A para medir las constantes de unión. Los resultados se presentan en las Tablas 18 y 19.

Las constantes de velocidad y equilibrio presentadas en la Tabla 18 se determinaron con un BIAcore (Pharmacia Biosensor) usando anticuerpo de cabra anti-IgG humana (específico de Fc) acoplado a la microplaca detectora y haciendo fluir sobre la misma una concentración saturante de mAb seguido de diversas concentraciones de antígeno (rCD4). Estas constantes se obtuvieron de tres experimentos usando mAb purificados.

35 TABLA 18

Constantes de Afinidad y Velocidad

Constantes de Velocidad (media \pm DT)

mAb humanos	$k_{\text{asoc}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_{\text{disoc}} (\text{s}^{-1})$	$K_{\text{a}} (\text{M}^{-1})$
1E11.15	$1,7 (\pm 0,15) \times 10^5$	$3,5 (\pm 0,09) \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^7$
6C1.10	$1,8 (\pm 0,44) \times 10^5$	$3,3 (\pm 0,04) \times 10^{-3}$	$5,4 \times 10^7$
1G1.9	$1,2 (\pm 0,18) \times 10^5$	$9,4 (\pm 0,22) \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^8$
6G5.1	$9,3 (\pm 1,1) \times 10^4$	$6,9 (\pm 0,36) \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^8$
10C5.6	$9,4 (\pm 0,98) \times 10^4$	$7,1 (\pm 0,36) \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^8$
2E4.2	$1,8 (\pm 0,10) \times 10^5$	$2,5 (\pm 0,05) \times 10^{-3}$	$7,1 \times 10^7$
4D1.4	$2,5 (\pm 0,55) \times 10^5$	$3,4 (\pm 0,15) \times 10^{-3}$	$7,3 \times 10^7$
7G2.2	$2,4 (\pm 0,31) \times 10^5$	$3,3 (\pm 0,07) \times 10^{-3}$	$7,3 \times 10^7$
1F8.3	$1,8 (\pm 0,24) \times 10^5$	$4,3 (\pm 0,14) \times 10^{-3}$	$4,3 \times 10^7$
1G2.10	$2,2 (\pm 0,26) \times 10^5$	$2,3 (\pm 0,03) \times 10^{-3}$	$9,8 \times 10^7$
chi Leu3a	$1,5 (\pm 0,35) \times 10^5$	$2,3 (\pm 0,12) \times 10^{-4}$	$6,6 \times 10^8$

ES 2 345 580 T3

Las constantes de velocidad y equilibrio presentadas en la Tabla 19 se determinaron con un BIAcore usando antígeno (rCD4) acoplado a la microplaca detectora y haciendo fluir mAb sobre la misma. Estas constantes se obtuvieron a partir de al menos tres experimentos independientes usando mAb purificados.

5

TABLA 19

Constantes de Aidez y Velocidad

10

mAb humanos	Constantes de velocidad (media \pm DT)		
	k_{asoc} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{disoc} (s^{-1})	K_a (M^{-1})
1E11.15	$2,8 (\pm 0,22) \times 10^5$	$4,5 (\pm 0,43) \times 10^{-5}$	$6,2 \times 10^9$
6C1.10	$2,0 (\pm 0,25) \times 10^5$	$4,0 (\pm 0,63) \times 10^{-5}$	$5,1 \times 10^9$
1G1.9	$9,1 (\pm 0,95) \times 10^4$	$2,2 (\pm 0,71) \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^9$
6G5.1	$1,1 (\pm 0,41) \times 10^5$	$1,0 (\pm 0,34) \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{10}$
10C5.6	$7,4 (\pm 1,5) \times 10^4$	$1,6 (\pm 0,57) \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^9$
2E4.2	$1,4 (\pm 0,15) \times 10^5$	$2,2 (\pm 0,25) \times 10^{-5}$	$6,3 \times 10^9$
4D1.4	$9,8 (\pm 0,69) \times 10^4$	$4,2 (\pm 1,3) \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^9$
7G2.2	$1,7 (\pm 0,20) \times 10^5$	$5,0 (\pm 0,42) \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^9$
1F8.2	$1,7 (\pm 0,13) \times 10^5$	$9,7 (\pm 1,2) \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^9$
1G2.10	$1,7 (\pm 0,04) \times 10^5$	$6,3 (\pm 0,49) \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^9$
chi Leu3a	$4,0 (\pm 0,45) \times 10^5$	$1,2 (\pm 0,25) \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{10}$
Leu3a	$1,5 (\pm 0,30) \times 10^5$	$4,2 (\pm 0,49) \times 10^{-6}$	$3,7 \times 10^{10}$

45

50

55

60

65

ES 2 345 580 T3

La Tabla proporciona constantes de equilibrio para mAb anti-CD4 presentados en la bibliografía científica.

TABLA 20

Constantes de Aidez y Velocidad descritas para anticuerpos monoclonales Anti-CD4

mAb humanos	Constantes de velocidad (media \pm DT)		
	k_{asoc} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{disoc} (s^{-1})	K_a (M^{-1})
CE9.1 ⁽⁴⁾	NR*	NR	$3,1 \times 10^{10}$
cMT412 ⁽¹⁾	NR	NR	$5,0 \times 10^9$
chi Leu3a ⁽²⁾	NR	NR	$1,0 \times 10^{11}$
BL4 ⁽³⁾	NR	NR	$5,5 \times 10^7$
BB14 ⁽³⁾	NR	NR	$3,3 \times 10^8$
cA2 ⁽⁵⁾	NR	NR	$1,8 \times 10^9$
CDP571 ⁽⁶⁾	NR	NR	$7,1 \times 10^9$

* NR = no descrito

(1) J. Cell. Biol. 15E:A179.

(2) J. Immunol. 145:2839.

(3) Clin. Immunol. Immunopath. 64:248.

(4) Biotechnology. 10:1455.

(5) Mol. Immunol. 30:1443.

(6) Solicitud de Patente Europea N° 0626389A1.

Las determinaciones de aidez y afinidad descritas anteriormente se realizaron con CD4 recombinante (rCD4). Para determinar la aidez de los anticuerpos monoclonales humanos por CD4 nativo (nCD4) se usó un ensayo de unión adicional que no requería que se modificase el anticuerpo. En concreto, se incubaron diluciones seriadas de anticuerpo con células SupT1 durante 6 h en hielo, se lavaron y se detectó cualquier anticuerpo unido con anticuerpo de cabra anti-Fc γ humano con FITC. La K_a se determinó a partir de la concentración de anticuerpo que proporciona la mitad de la fluorescencia máxima (se usó un ajuste de cuatro parámetros). Los resultados demuestran que los diez anticuerpos monoclonales humanos se unen muy bien a nCD4, con valores $K_a > 10^9 M^{-1}$ (Tabla 21). La mayoría de los anticuerpos, incluyendo Leu3a quiméricos, se unen peor a nCD4 que a rCD4. Esto podría deberse a diferencias en la densidad de antígeno así como a diferencias entre los dos antígenos.

ES 2 345 580 T3

TABLA 21

Constantes de Avidéz Determinadas por Citometría de Flujo

5

mAb humanos	Valores de Ka (M-1)		Proporción de Ka
	rCD4	nCD4*	(rCD4/nCD4)
1E11.15	6,2 x 10 ⁹	3,3 x 10 ⁹	1,9
6C1.10	5,1 x 10 ⁹	3,1 x 10 ⁹	1,6
15 1G1.9	4,2 x 10 ⁹	2,3 x 10 ⁹	1,9
6G5.1	1,1 x 10 ¹⁰	1,9 x 10 ⁹	5,9
20 10C5.6	4,5 x 10 ⁹	1,8 x 10 ⁹	2,5
2E4.2	6,3 x 10 ⁹	1,1 x 10 ⁹	5,8
25 4D1.4	2,3 x 10 ⁹	2,0 x 10 ⁹	1,2
7G2.2	3,4 x 10 ⁹	3,3 x 10 ⁹	1,0
30 1F8.2	1,7 x 10 ⁹	3,2 x 10 ⁹	0,5
1G2.10	2,7 x 10 ⁹	1,9 x 10 ⁹	1,4
35 chi Leu3a	3,4 x 10 ¹⁰	5,6 x 10 ⁹	6,1

35

* Se incubaron anticuerpos monoclonales humanos en diluciones seriadas con células SupT1 durante 6 h, se lavaron dos veces y se incubaron con antisueros de cabra anti-Fc γ humano conjugados con FITC, se lavaron y se fijaron. La Ka se calculó a partir de la concentración de anticuerpo que producía la mitad de la fluorescencia máxima según se determinó a partir de un ajuste de cuatro parámetros.

50

Ejemplo 41

Identificación de Secuencias de Nucleótidos que Codifican Anticuerpos IgGkappa Humanos Anti-CD4

55

Este ejemplo demuestra que cada uno de los hibridomas ensayado produce sólo un transcrito de ARN de cadena ligera o pesada funcional, que concuerda con una exclusión alélica de funcionamiento apropiado. Además, el análisis de secuencia de segmentos CDR de cadena ligera y pesada indica que ha tenido lugar una mutación somática de los transgenes de inmunoglobulina.

60

Se usaron células de cinco líneas celulares de hibridoma individuales (1E11, 1G2, 6G5, 10C5 y 4D1) que secretan anticuerpos monoclonales de IgG kappa humana reactivos con CD4 humano y proceden de ratones transgénicos JHD/JCKD/HC2/KCo5 para aislar ARN que codifica cada uno de los anticuerpos individuales (Fishwild *et al.* 1996, Nature Biotechnology 14, 845-851). El ARN se usó como sustrato para sintetizar ADNc, que después se usó para amplificar secuencias de transcritos kappa y gamma de Ig humana mediante PCR usando cebadores específicos para VH, Vkappa, Cgamma y Ckappa humanas (Taylor *et al.* 1992, Nucleic Acids Res. 20, 6287-6295; Larrick, J.W., *et al.* (1989), Bio/Technology. 7. 934-938; Marks, J.D., *et al.* (1991). Eur. J. Immunol. 21. 985-991; Taylor, *et al.*, 1994, Int. Immunol. 6, 579-591). Las secuencias de cadena ligera kappa y pesada de Ig amplificadas se clonaron en plásmidos

65

ES 2 345 580 T3

bacterianos y se determinaron las secuencias de nucleótidos. El análisis de las secuencias que abarcaban uniones VJ de cadena ligera y VDJ de cadena pesada puso de manifiesto transcritos de cadena ligera y pesada en fase de lectura para cada uno de los 5 clones, y en algunos casos transcritos estériles fuera de fase de lectura adicionales que representaban alelos no funcionales. De acuerdo con una exclusión alélica de funcionamiento apropiado, en ningún caso se identificó más de un transcrito de cadena ligera o pesada funcional único para cada uno de los clones individuales. A las secuencias de nucleótidos parciales para cada uno de los diez transcritos funcionales se les asignaron las SEC ID siguientes: gamma de 1E11 [SEC ID N°: 199]; kappa de 1E11 [SEC ID N°: 200]; gamma de 1G2 [SEC ID N°: 201]; kappa de 1G2 [SEC ID N°: 202]; gamma de 6G5 [SEC ID N°: 203]; kappa de 6G5 [SEC ID N°: 204]; gamma de 10C5 [SEC ID N°: 205]; kappa de 10C5 [SEC ID N°: 206]; gamma de 4D1 [SEC ID N°: 207]; kappa de 4D1 [SEC ID N°: 208] y se presentan en la Tabla 22. Toda las secuencias se presentan en una orientación 5' a 3'.

TABLA 22

Secuencia de nucleótidos parcial para transcritos funcionales

gamma de 1E11 [SEC ID N°: 199]

**TGCACAAGAACATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGAT
GGGTCCCTGTCCCAGGTGCAGCTTCATCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGG
AGACCCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTTCAGTGGTTACTTCTGGA
GCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAGGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCCATCATC
GTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCGAGAGTCGAGTCACCCTATCAGTAGACA
CGTCCAAAACCAGTTCTCCCTGAGGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTG
TGTATTACTGTGCGAGAGACATTAATGTTTCGGGGAGTACCTCACTGGGGCCAGG
GAACCCTGGTCACC**

kappa de 1E11 [SEC ID N°: 200]

**GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTA
CTGTCCAGCAGTATCGTAGCTCACCCCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGAT
CAAACGAACTGTGGCGGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC**

gamma de 1G2 [SEC ID N°: 201]

**TCCACCATCATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTCCTCCTGGCTGTTCTCCAAGGA
GTCTGTGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAG
TCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGTTACTGGATCGCC
TGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCGATCCTGCT
GACTCTGATACCAGATACAACCCGTCCCTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGAC
AAGTCCATCAGTACCGCCTATTTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCC
ATGTATTACTGTGCGAGACCAGCGAACTGAACTGGTACTTCGTTCTCTGGGGCCGT
GGCACCCCTGGTCACT**

kappa de 1G2 [SEC ID N°: 202]

ES 2 345 580 T3

**GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTA
CTGTCAAACAGTTTATTAGTTACCCCTCAGCTCACTTTCGGCGGACGGACCAGGGTGG
GATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC**

gamma de 6G5 [SEC ID N°: 203]

**TGCACAAGAACATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGAT
GGGTCTGTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGG
AGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCCTCAGTGGTTACTACTGGA
GCTGGATCCGCCAGCCCCAGGTAAGGGGCTGGAGTGCATTGGGGAAATCAATCATA
GTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTCGACA
CGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTG
TGTATTACTGTGCCAGAGTAATTAATTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCTGG
TCACC**

kappa de 6G5 [SEC ID N°: 204]

**GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTA
TTGTCAAACAGGCTAATAGTTTCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT
CAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC**

gamma de 10C5 [SEC ID N°: 205]

**ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCTGTCC
CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCC
CTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCCTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCCCCAGGTAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGAAGCACC
AACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTCGACACGTCCAAAGAAC
CAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGT
GCGAGAGTAATTAATTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAACGCTCTCC
TCAG**

kappa de 10C5 [SEC ID N°: 206]

**ATGGACATGATGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGCTCCTGCTGCTCTGGTTCCCAGGT
TCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTACGA
GACAGAGTCACCATCACTTGTCCGGCGAGTCAGGATATTAGCAGCTGGTTAGCCTGG
TATCAGCATAAACAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTG
CAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAAACAGGCTAAT
AGTTTCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC**

gamma de 4D1 [SEC ID N°: 207]

ES 2 345 580 T3

ATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTCCTCCTGGCTGTTCTCCAAGGAGTCTGTGCC
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAG
ATCTCCTGTAAGGGTTCCTGGATACAGCTTTACCGGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGC
CAGATGCCCGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGA CTCTGAT
ACCACTACAGCCCGTCCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATC
AGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTAC
TGTGCGAGAGACCAACTGGGCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACC
GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAG
AAGCTT

kappa de 4D1 [SEC ID N°: 208]

ATGGACATGGAGTTCCTCGTTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTTCCAGGT
GCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCAGTGTCTGCATCTGTAGGA
GACAGAGTCACCATCACTTGTGGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGG
TATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCTAAGTCCCTGATCTATTCTGCATCCAGTTTG
CAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATGAT
AGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCT
GCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAAGCTT

El análisis de estas secuencias de ADN demuestra que los 5 clones de hibridoma representan descendientes de 4 células B primarias individuales. La Tabla 23 muestra las secuencias de aminoácidos derivadas de cada una de las diez regiones CDR₃, y las asignaciones para segmentos génicos de línea germinal incorporados en cada uno de los genes que codifican estos transcritos. Las asignaciones de línea germinal se basan en secuencias de genes publicadas disponibles en el National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md. Véase también: Cook *et al.* 1994, Nature Gene. 7, 162-168; Tomlinson *et al.* 1992, J. Mol. Biol. 227, 776-798; Matsuda *et al.* 1993, Nature Genet. 3, 88-94; Schable y Zachau, 1993, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374, 1001-1022; Cox *et al.* 1994, Eur. J. Immunol. 24, 827-836; Ravetch *et al.* 1981, Cell 27, 583-591; Ichihara *et al.* 1988, EMBO J. 7, 4141-4150; Yamada *et al.* 1991, J. Exp. Med. 173, 395-407; Sanz, 1991, J. Immunol. 147, 1720-1729.

TABLA 23

Uso de Segmentos V (D) J de la Línea Germinal en Transcritos de Hibridoma

clon	h.c CDR3	VH	DH	JH	1.c. CDR3	Vk	Jk
1E11	DITMVRGVPH (SEC ID N°: 209)	VH4-34	DXP'1	JH4	QQYGSSPLT (SEC ID N°: 210)	VkA27/A11	Jk4
1G2	PANWNWYFVL (SEC ID N°: 211)	VH5-51	DHQ52	JH2	QQFISYPQLT (SEC ID N°: 212)	VkL18	J24
6G5	VINWFDP (SEC ID N°: 213)	VH4-34	n.d.	JH5	QQANSFPYT (SEC ID N°: 214)	VkL19	Jk2
10CS	VINWFDP	VH4-34	n.d.	JH5	QQANSFPYT	VkL19	Jk2
4D1	DQLGLFDY (SEC ID N°: 215)	VH5-51	DHQ52	JH4	QQYD5YPYT (SEC ID N°: 216)	VkL15	Jk2
n.d. no pudo determinarse a partir de la secuencia de nucleótidos.							

Ejemplo 42

Construcción de Minigenes para la Expresión de Anticuerpos IgKappa Humanos Anti-CD4 en Líneas Celulares Transfectadas

Este ejemplo demuestra el proceso de generar un gen totalmente artificial que codifique un polipéptido de inmunoglobulina (es decir, una cadena ligera o cadena pesada de inmunoglobulina). Se construyeron plásmidos de modo que podían usarse secuencias de ADNc de cadena ligera V y de cadena pesada V amplificadas por PCR para reconstruir minigenes de cadena ligera y pesada completos.

El plásmido de cadena ligera kappa pCK7-96 incluye la región constante kappa y el sitio de poliadenilación [SEC ID N°: 217], de tal forma que secuencias kappa amplificadas con cebadores 5' que incluyen HindIII, sitios cadena arriba de la metionina de inicio, pueden digerirse con HindIII y BdsI y clonarse en pCK7-96 digerido con HindIII y BdsI para reconstruir una secuencia codificante de cadena ligera completa junto con un sitio de poliadenilación. Este casete puede aislarse como un fragmento HindIII/NotI y ligarse con secuencias promotoras de la transcripción para generar un minigen funcional para transfección en células.

El plásmido de cadena pesada gamma 1, pCG7-96, incluye la región constante gamma 1 y el sitio de poliadenilación [SEC ID N°: 218] de modo que pueden digerirse secuencias gamma amplificadas con cebadores 5' que incluyen sitios HindIII cadena arriba de la metionina de inicio con HindIII y AgeI y clonarse en pCG7-96 digerido con HindIII y AgeI para reconstruir una secuencia codificante de cadena pesada gamma1 completa junto con un sitio de poliadenilación. Este casete puede aislarse como un fragmento HindIII/SalI y ligarse con secuencias promotoras de la transcripción para generar un minigen funcional para su transfección en células.

El siguiente ejemplo demuestra cómo pueden usarse datos de secuencia de nucleótidos a partir de hibridomas para reconstruir minigenes de cadena ligera y pesada de Ig funcionales. Las secuencias de nucleótidos de transcritos de cadena ligera y pesada de hibridomas de 6G5 y 10C5 se usaron para diseñar un conjunto solapante de oligonucleótidos sintéticos para generar secuencias V sintéticas con capacidades codificantes de aminoácidos idénticas a las de secuencias naturales. Las secuencias de cadena ligera kappa y pesada sintéticas (designadas HC6G5 [SEC ID N°: 219] y LC6G5 [SEC ID N°: 220] diferían de las secuencias naturales de tres formas: se interrumpieron hebras de bases de nucleótidos repetidas para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y de amplificación por PCR; se incorporaron sitios de inicio de la traducción óptimos de acuerdo con las normas de Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266, 19667-19870); y se generaron por ingeniería genética sitios HindIII cadena arriba de los sitios de inicio de traducción.

A. Cadena ligera kappa sintética

Reacción 1 de PCR de cadena ligera

Se combinaron los oligonucleótidos siguientes: o-548 [SEC ID N°: 221], o-549 [SEC ID N°: 222], o-550 [SEC ID N°: 223], o-551 [SEC ID N°: 224], o-552 [SEC ID N°: 225], o-563 [SEC ID N°: 226], o-564 [SEC ID N°: 227], o-565 [SEC ID N°: 228], o-566 [SEC ID N°: 229], o-567 [SEC ID N°: 230] y se amplificaron con los 2 cebadores siguientes: o-527 [SEC ID N°: 231] y o-562 [SEC ID N°: 232].

Reacción 2 de PCR de cadena ligera

Se combinaron los oligonucleótidos siguientes: o-553 [SEC ID N°: 233], o-554 [SEC ID N°: 234], o-555 [SEC ID N°: 235], o-556 [SEC ID N°: 236], o-557 [SEC ID N°: 237], o-558 [SEC ID N°: 238], o-559 [SEC ID N°: 239], o-560 [SEC ID N°: 240], o-561 [SEC ID N°: 241], o-562 [SEC ID N°: 232], y se amplificaron con los 2 cebadores siguientes: o-552 [SEC ID N°: 225] y o-493 [SEC ID N°: 242].

Reacción 3 de PCR de cadena ligera

Los productos de las reacciones 1 y 2 de PCR de cadena ligera se combinaron después y se amplificaron con los dos cebadores siguientes: o-493 [SEC ID N°: 242] y o-527 [SEC ID N°: 231].

El producto de la reacción 3 de PCR de cadena ligera se digirió después con HindIII y BbsI y se clonó en pCK7-96 digerido con HindIII/BbsI [SEC ID N°: 217] para generar pLC6G5 [SEC ID N°: 243].

B. Cadena pesada gamma sintética

Reacción 1 de PCR de cadena pesada

Se combinaron los oligonucleótidos siguientes: o-528 [SEC ID N°: 244], o-529 [SEC ID N°: 245], o-530 [SEC ID N°: 246], o-531 [SEC ID N°: 247], o-532 [SEC ID N°: 248], o-543 [SEC ID N°: 249], o-544 [SEC ID N°: 250], o-545

ES 2 345 580 T3

[SEC ID N°: 251], o-546 [SEC ID N°: 252], o-547 [SEC ID N°: 253] y se amplificaron con los 2 cebadores siguientes: o-496 [SEC ID N°: 254] y o-542 [SEC ID N°: 255].

5 *Reacción 2 de PCR de cadena pesada*

Se combinaron los oligonucleótidos siguientes: o-533 [SEC ID N°: 256], o-534 [SEC ID N°: 257], o-535 [SEC ID N°: 258], o-536 [SEC ID N°: 259], o-537 [SEC ID N°: 260], o-538 [SEC ID N°: 261], o-539 [SEC ID N°: 262], y-540 [SEC ID N°: 263], o-541 [SEC ID N°: 264], o-542 [SEC ID N°: 255], junto con el fragmento BbsI de 439 pb aislado de pCG7-96 [SEC ID N°: 218] y se amplificaron con los 2 cebadores siguientes: o-490 [SEC ID N°: 265] y o-520 [SEC ID N°: 266].

15 *Reacción 3 de PCR de cadena pesada*

Los productos de reacciones de cadena pesada 1 y 2 se combinaron después y se amplificaron con los dos cebadores siguientes: o-520 [SEC ID N°: 266] y o-521 [SEC ID N°: 267].

El producto de la reacción 3 de cadena pesada se digirió después con HindIII y Agel y se clonó en pCG7-96 digerido con HindIII/Agel [SEC ID N°: 218] para generar pHCG5 [SEC ID N°: 268].

25 TABLA 24

Cebadores, Vectores y Productos Usados en la Construcción de Minigenes

pCK7-96 [SEC ID N°: 217]

30 **TCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTGCTTCCGGCTGCGGCGAGCG**
GTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA
GGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG
35 **TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAATAATCGACGC**
TCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCT
GGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCC
40 **GCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTC**
AGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCA CGAACCCCCCGTTTCAG
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC
45 **GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTA**
GGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACA
GTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGC
50 **TCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAG**

55

60

65

CAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGG
 TCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTCGTGATGAGATTATCA
 5 AAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAA
 AGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGCAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCT
 ATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTGCTGTAG
 10 ATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGA
 GACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCC
 GAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGC
 15 CGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATT
 GCTACAGGCATCGTGGTGTCAOGCTCGTTCGTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGT
 TCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGC
 20 TCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGTCAGAAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATG
 GTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
 GTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCATTCGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGT
 25 TGCTCTTCCCGCGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAA
 GTGCTCATCATTTGGAAAAAGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTG
 TTGAGATCCAGTTGATGTAAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTT
 ACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGACCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAG
 30 GGAATAAGGGCGACACGGAAATGTGAAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTAT
 TGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTATG
 AAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC
 35 TAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCC
 TTTCTGCTCTCGCGCTTTCCGGTATGACGGTGAACAACCTCTGACACATGCAGCTCCCG
 GAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAACCCCGTCAGGGC
 40 CGCTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGGCTGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAG
 ATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGA
 AAATACCGCATCAGGCGCCATTCCGCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGCCGA
 45 TCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGG
 CGATTAAGTTGGGTAAAGCCAGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCC
 AGTGCCAAGCTAGCGGCCCGGTCCAACCACCAATCTCAAAGCTTGGTACCCGGGAG
 50 CCTGTTATCCCAGCACAGTCTTGGAAAGAGGCACAGGGGAAATAAAAGCGGACGGAGG
 CTTTCCTTGACTCAGCCGCTGCCCTGCTCTTCTCAGACCTGTTCTGAATTCCTAACT
 CTGAGGGGGCTCGGATGACGTTGCCATTCTTTGCCCTAAAGCATTGAGTTTACTGCAAG
 55 GTCAGAAAAGCATGCAAAAGCCCTCAGAAATGGCTGCAAAGAGCTCCAACAAAAATTT
 TAGAACTTTATTAAGGAATAGGGGAAGCTAGGAAGAACTCAAAAATCAAGATTT
 TAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTATAAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTTCT
 60 GTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAACCAACACCCCAAGGGCAGAACT
 TTGTTACTTAAACACCATCCTGTTTGTCTTCTTCCTCAGGAACTGTGGCTGCACCAT

65

CTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG
TGTGCCTGCTGAATAAATTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATA
5 ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA
AAGTCTACGCCCTGCGAAGTACCCCATCAGGGCCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT
10 TCAACAGGGGAGAGTGTAGAGGGAGAAGTGCCCCCACCTGCTCCTCAGTTCAGCC
TGACCCCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCPTTTTCCAGAGGGACCTACCCCTAT
TGCGGTCTCCAGCTCATCTTTCACCTCACCCCCCTCCTCCTCCTTGGCTTTAATTA
15 TGCTAATGTTGGAGGAGAATGAATAAATAAAGTGAATCTTTGCACCTGTGGTTCCTC
TCTTTCCTCAATTTAATAATTATPATCTGTTGTTTACCAACTACTCAATTTCTCTTA
TAAGGGACTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCAATTTATAAAAATCATCCT
20 TCATTTATTTTACCCTATCATCCTCTGCAAGACAGTCCCTCCCTCAAACCCACAAGC
CTTCTGTCTCACAGTCCCTGGGCCATGGATCCTCACATCCCAATCOGCGGCCGCA
ATTGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTC
25 CACACAACATACCAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCATGAGTGA
GCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGT
CGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTG
GGCGC

30 pCG7-96 [SEC ID N°: 218]

GAACTCGAGCAGCTGAAGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTTTGGGGC
35 AGGGAGGGGGCTAAGGTGAGGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAATGCCCAT
GAGCCAGACTGGACGCTGAACCTCGCGGACAGTTAAGAACCAGGGGCCTCTGC
GCCCTGGGGCCAGCTCTGTCCACACCGCGGTACATGGCACCCCTCTCTTGACGC
40 CTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG
GGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT
GTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACA
45 GTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAAGCCAGCAACCAAGGTGGA
CAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGC
TCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAGCAAGG
50 CAGGCCCGTCTGCCTCTTCAACCCGGAGGCCTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGG
AGAGGGTCTTCTGGCTTTTCCCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTA
ACCCAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATA
55 TCCGGGAGGACCCTGCCCTGACCTAAGCCCACCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCC
CTCAGCTCGGACACCTTCTCCTCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTG
CAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGGTAAGCCAG
60 CCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGCCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCC

5 AGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCCTCAGCACCT
 GAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC
 10 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
 CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
 AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC
 15 CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
 CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAACATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTG
 CGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCCAACCTCTGCCCTGAGAGTGACCGC
 TGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAAACACAGGTGTACACCCTGCC
 20 CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGG
 CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA
 CTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAA
 GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
 GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
 25 ATGAGTGGACGGCCGGCAAGCCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGTCCGACGAGGAT
 GCTTGGCAGTACCCCTGTACATACTTCCCCGGGCGCCAGCATGGAATAAAGCAC
 CCAGCGCTGCCCTGGGCCCCCTGCGAGACTGTGATGGTTCTTTCCACGGGTGAGGCCG
 AGTCTGAGCCCTGAGTGGCATGAGGGAGGCAGAGCGGTCCCACTGTCCCCACACTG
 30 GCCCAGGCTGTGCAGGTGTGCCTGGGCCCCCTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGC
 CCTCGGCAGGTTGGGGATTGCGCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGCAGCACCTGCCCTG
 GGCTGGGCCACCGGAAGCCCTAGGAGCCCCGCGGGACAGACACACAGCCCCCTGCCCTC
 35 TGTAGGAGACTGTCTCTGTCTGTGAGCGCCCCCTGTCTCCCGACCTCCATGCCCACT
 CGGGGGCATGCCTGCAGGTGCACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATPCA
 TCGATGATATCAGATCTGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTGATAAGC
 CAGGTTAACCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATT
 40 GGGCGCTCTTCCGCTTCTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTCGGCTGCGG
 CGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGAT
 AACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAG
 45 GCOGCGTTGCTGGGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAAT
 CGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTT
 CCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATAC
 50 CTGTCCGCCTTTCTCCCTCGGGAAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCAGCTGTAGG
 TATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGTTCCCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAGGAACCCCCC
 GTTCAGCCCGACCGCTGCCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTA
 55 AGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGG
 TATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGA
 AGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTT
 60 GGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCAACCGCTGATAGCGGTGGTTTTTTTGTTCG

65

AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCT
ACGGGCTCTGACCCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATCAGA
5 TTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCA
ATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCACTGAG
GCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGITGCCTGACTCCCCGTC
10 GTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATA
CCGCGAGACCCACGCTCACGGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGA
AGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAT
15 TGTTCGCCGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCCAACTTGT
CCCATTCGTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTACGC
TCCGGTTCCTAACGATCAAGGGCAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCG
20 GTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCA
CTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGC
TTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGA
25 CCGAGTTCCCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATAACCGCCACATAGCAGAACT
TFAAAGTGCTCATCATTTGAAAAAGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTA
CCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAAACCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCA
TCTTTTACTTTACACAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCA
30 AAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAA
TATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGT
ATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCCCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCT
35 GACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCAGG
AGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAG
CTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGCAAGCCCCGT
40 CAGGGCGCGTCAGCCGCTGTTGGCGGGTGTCCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCA
GAGCAGATTGTACTGAGAGTGACCATATGGACATATTGTCGTTAGAACGCGGCTAC
AATTAATACATAACCTTATGTATCATAACATACGATTTAGGTGACACTATA

45 o-548 [SEC ID N°: 221]

ATGGTCCCAGCTCAGCTCCTCGGTCTCCTGCTGCTCTGGTTCCC

50 o-549 [SEC ID N°: 222]

AGGTTCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCG

o-550 [SEC ID N°: 223]

55 TGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCCGGCG

o-551 [SEC ID N°: 224]

AGTCAGGATATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCATAAACC

60 o-552 [SEC ID N°: 225]

AGGTAAAGCACCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGC

65 o-563 [SEC ID N°: 226]

AGGAGCTTAGGTGCTTTACCTGGTTTATGCTGATACCAGGCTAA

o-564 [SEC ID N°: 227]

CCAGCTGCTAATATCCTGACTCGCCCGACAAGTGATGGTGACTC

o-565 [SEC ID N°: 228]

TGTCTCCTACAGATGCAGACACGGAAGATGGAGACTGGGTCATC

o-566 [SEC ID N°: 229]

TGGATGTGCGCATCTGGAACCTGGGAACCAGAGCAGCAGGAGACC

o-567 [SEC ID N°: 230]

GAGGAGCTGAGCTGGGACCATCATGGTGGCAAGCTTAGAGTC

o-527 [SEC ID N°: 231]

GACTCTAAGCTTGCCACCATGATGGTCC

o-562 [SEC ID N°: 232]

ACCTTGATGGGACACCACCTTGCAAACCTGGATGCAGCATAGATC

o-553 [SEC ID N°: 233]

AAAGTGGTGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGAAGTGGATCTGGGACA

o-554 [SEC ID N°: 234]

GATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGC

o-555 [SEC ID N°: 235]

AACTTACTATTGTCAACAGGCTAATAGTTTCCCGTACACTTTTG

o-556 [SEC ID N°: 236]

GTCAGGGAACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA

o-557 [SEC ID N°: 237]

TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA

o-558 [SEC ID N°: 238]

GGGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGA

o-559 [SEC ID N°: 239]

TCTCCAGCTTGGTCCCTGACCAAAGTGTACGGGAAACTATTA

o-560 [SEC ID N°: 240]

GCCTGTTGACAAATAGTAAGTTGCAAATCTTCAGGCTGCAGGCT

o-561 [SEC ID N°: 241]

GCTGATGGTGAGAGTGAATCTGTCCCAGATCCACTTCCGCTGA

o-493 [SEC ID N°: 242]

TCAAAGCTCATCAGATGGC

ES 2 345 580 T3

pLC6G5 [SEC ID N°: 243]

5 TC TTCGGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTCGTTGGCTGCGGCGAGCG
GTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA
10 GAAAGAACATGTGACCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG
TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGC
TCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGCACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCT
15 GGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCC
GCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGGCTGTAGGTATCTC
AGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTT CAG
20 CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC
GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTA
GGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACA
25 GTA TTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCACTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGC
TCTTGATCCGGCAAACAAACCAACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAG
CAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGG
30 TCTGACGCTCAGTCCAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCA
AAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATPAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAA
AGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCT
35 ATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAG
ATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGA

ES 2 345 580 T3

5 GACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCC
 GAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGC
 CGGAAGCTAGAGTAACTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATT
 GCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACAGCTCCGGT
 10 TCCCAACGATCAAGGGGAGTTACATGATCCCCATGTTGIGCAAAAAGCGGTTAGC
 TCCTTGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATG
 GTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
 GTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGT
 15 TGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAA
 GTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTG
 TTGAGATCCAGTTCGATGTAAACCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTT
 ACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAG
 20 GGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTAT
 TGAAGCATTATCAGGGTTATTCTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAC
 AAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC
 25 TAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCC
 TTTCTGCTCGCGCGTTTCCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCG
 GAGACGGTCCAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGC
 30 GCGTCAGCGGGCTGTTGGCGGGTGTCCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCACAGCAG
 ATTGTAAGTGCAGCTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGA
 AAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGA
 35 TCGGTCCGGGCTCTTCGCTATTAACCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGG
 CGATTAAGTTGGTAAACGCCAGGCTTTCCAGTCAGACGTTGTAAAACGACGGCC
 AGTGCCAAGCTAGCGGCCCGGGTCCAACCACCAATCTCAAAGCTTGCCACCATGATG
 40 CTCACAGCTCAGCTCCTCGGTCTCCTGCTGCTCTGGTCCAGGTTCCAGATGCGAC
 ATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
 ATCACTTGTGGGGCAGTCCAGGATATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCATAAAA
 45 CCAGGTAAGCACCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGTGTG
 CCATCAAGGTTCCAGCGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC
 CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAATAGTTTCCCGTAC
 ACTTTTGGTCCAGGGAACCAAGCTGGAGATCAAACGAACGTGTGGCTGCACCATCTGTC
 50 TTCACTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGC
 CTGCTCAATAAATTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC
 CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC
 55 TACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAAGTC
 TACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAAC
 AGGGGAGAGTGTAGAGGGAGAAGTGCCCCACCTGCTCCTCAGTTCCAGCCTGACC
 60 CCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCCTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTATTGCGG

65

TCCTCCAGCTCATCTTTCACCTCACCCCCCTCCTCCTCCTGGCTTTAATTATGCTA
ATGTTGGAGGAGAATGAATAAATAAAGTGAATCTTTGCACCTGTGGTTTCTCTCTTT
5 CCTCAATTTAATAATPATTATCTGTTGTTTACCACTACTCAATTTCTCTTATAAGG
GACTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCAATTTATAAAAATCATCCTTCATT
CTATTTTACCCTATCATCCTCTGCAAGACAGTCCTCCCTCAAACCCACAAGCCTTCT
10 GTCCTCACAGTCCCCTGGGCCATGGATCCTCACATCCCAATCCGCGGCCGCAATTCCG
TAATCATGGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATGTTTATCCGCTCACAATTCCACAC
AACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA
15 CTCACATTAATTTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGC
CAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATTTGGGCGC

o-528 [SEC ID N°: 244]

20 TTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCTAGATGGGTCTGTCTC

o-529 [SEC ID N°: 245]

25 AGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTC

o-530 [SEC ID N°: 246]

GGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGTTCCCTTC

30 o-531 [SEC ID N°: 247]

AGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCACCAGGTAAGG

o-532 [SEC ID N°: 248]

35 GTCTGGAGTGGATTGGTGAATCAATCATAGTGGAAGCACCAA

o-543 [SEC ID N°: 249]

40 TTCACCAATCCACTCCAGACCCTTACCTGGTGGCTGGCGGATC

o-544 [SEC ID N°: 250]

CAGCTCCAGTAGTAACCACTGAAGGAACCAACCATAGACAGCGC

45 o-545 [SEC ID N°: 251]

AGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCAACAGTCCTGCGCC

o-546 [SEC ID N°: 252]

50 CCACTGCTGTAGCTGCACCTGAGACAGGACCCATCTAGGAGCT

o-547 [SEC ID N°: 253]

55 GCCACCAGGAGGAGGAAGAACCACAGGTGTTTCATGGTGGCAAGCTTG

o-496 [SEC ID N°: 254]

CATGAAACACCTGTGGTTCTTCC

60 o-542 [SEC ID N°: 255]

TCTTGAGAGACCGGTTGTAGTTGGTGCTTCCACTATGATTGAT

65 o-533 [SEC ID N°: 256]

5 GAACTCGAGCAGCTGAAGCTTGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTG
 CTGGCAGCTCCTAGATGGGTCTGTCTCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGA
 10 CTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGTTCCTTC
 AGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCACCAGGTAAGGGTCTGGAGTGGATT
 GGTGAAATCAATCATAGTGAAGCACCAACTACAACCCCTCTCTCAAGAGTCGAGTC
 15 ACCATATCAGTAGACACGTCGAAGAACAGTTCTCTCTGAAACTGAGCTCTGTGACC
 GCTGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTAATTAATTTGGTTCGACCCTTGG
 GGCCAGGGAAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCAACCAAGGGCCCATCGGTCTTC
 CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
 20 GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACC
 AGCGGCGTGACACCTTCCCGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
 AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG
 AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCA CAG
 25 GGAGGGAGGGTGTCTGTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCTGCTGGACGCATCCCGG
 CTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCCCGTCTGCCTCTTCAACCCGGAG
 GCCTCTGCCCCGCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTCCCCAGGC
 TCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCCAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGG
 30 TGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCCCTGACCTAAG
 CCCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCCTCCCA
 GATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCA
 CACATGCCACCCGTGCCAGGTAAGCCAGCCCAGGCCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGGG
 35 GGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACA
 CGTCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC
 TCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAT
 GCGTGGTGGTGGACCTGAGCCACGAACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG
 40 ACCGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
 CGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
 AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCT
 45 CCAAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTC
 GGCCCCACCTCTGCCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAG
 CCCCAGAAACCAAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC

50

55

60

65

ES 2 345 580 T3

CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAAGACCAAGCCAGCCTCCCGTCTGGAG
5 TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACCACTACAG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGTGGCAGCGCCGGCAAGCCCCCGC
10 TCCCCGGGCTCTCGCGTTCGCACGAGGATGCTTGGCACGTACCCCTGTACATACTT
CCCCGGCGCCAGCATGGAATAAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGGCCCCCTGCGAGAC
TGATGATGGTTCTTCCACGGGTGAGGCCAGTCTGAGGCCTGAGTGGCATGAGGGAG
15 GCAGAGCGGTCCCACTGTCCCCACACTGGCCAGGCTGTGCAGGTGTGCTTGGCC
CCCTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGCCCTCGGCAGGGTGGGGGATTTGCCAGCG
TGGCCCTCCCTCCAGCAGCACCTGCCCTGGGCTGGGCCACGGGAAGCCCTAGGAGCC
20 CCTGGGGACAGACACAGCCCCTGCCCTCTGTAGGAGACTGCTCTGTTCTGTGAGCG
CCCCTGTCTCCCGACCTCCATGCCCACTCGGGGGCATGCCCTGCAGGTCCGACTCTAG
AGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGATCTGCCGGTCTCCC
25 TATAGTGAGTCGTATTAATTTGATAAGCCAGGTTAACCTGCATTAATGAATCGGCC
AACCGCGGGGAGAGGGCGTTTGGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTG
ACTCGCTGCGCTCGGTCTGGCTGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGG
TAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAG
30 GCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGC
TCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC
CGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTC
35 CTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCG
TGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCCCTTCGCT
CCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCG
40 GTAATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCCCACTGGCAGCAG
CCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGGTGCTACAGAGTTCTTGA
AGTGGTGGCCTAACACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGC
45 TGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCA
CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGGCGAGAAAAAAG
GATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAA
50 ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCC
TTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGT
CTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGGGCACCTATCTCAGCGATCTGCTTATTTT
55 GTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGATAGATAACTACGATACGGGAGGGCT
TACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCAGCTCACCGGCTCCAG
ATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGCGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTGCAA
60 CTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTT
CGCCAGTTAATAGTTTGGCACAAGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTAC

GCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTA
CATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTG
5 TCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATT
CTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGCTGAGTACTCAACCA
AGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATAC
10 GGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGGAAAACGTT
CTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAAC
CCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGT
15 GAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAT
GTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATT
GTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTTC
20 CGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAAACCATTTATTCATGA
CATTAACTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTG
ATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGT
25 AAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCACGGGTGTTGGCGGGT
GTCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTA CTGAGAGTGCACCATA
TGGACATATTGTCGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAAACCTTATGTATCATA
30 ACATACGATTTAGGTGACACTATA

HC6G6 (SEC ID N° 219)

AAGCTTGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCTAGA
35 TGGGTCTGTCTCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCG
GAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGTTCCTTCAGTGGTTACTACTGG
AGCTGGATCCGCCAGCCACCAGGTAAGGGTCTGGAGTGGATTGGTGAATCAATCAT
40 AGTGAAGCACCAACTACAACCCGTCTCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGAC
ACGTCCAAGAACCAGTTCTCTCTGAAACTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCT
GTGTATTACTGTGCGAGAGTAATTAATTGGTTCGACCCTTGGGGCCAGGGAAACCTG
45 GTCACCGTCTCCTCAGCCTCAACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCC
TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
CCCGAACCGGT

LC6G5 [SEC ID N°: 220]

AAGCTTGCCACCATGATGGTCCCAGCTCAGCTCCTCGGTCTCCTGCTGCTCTGGTTC
50 CCAGGTTCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCT
GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCCGGCGAGTCAGGATATTAGCAGCTGGTTA
55 GCCTGGTATCAGCATAAACCAGGTAAGCACCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCC
AGTTTGCAAAGTGGTGTCCCATCAAGGTTACGCGGAAGTGGATCTGGGACAGATTC
ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTACTATTGTCAACAG
60 **GCTAATAGTTTCCCGTACACTTTTGGTCAGGGAACCAAGCTGGAGATCAAACGAACT**
GTGGCTGCACCATCTGTCTTC

Ejemplo 43

Unión de Anticuerpos Monoclonales Humanos Anti-CD4 a Linfocitos de Primate No Humanos

5 Es deseable poder realizar estudios de farmacocinética y toxicología preclínicos de anticuerpos monoclonales humanos anti-CD4 en modelos animales. Además es deseable para algunos fines que el animal sea un primate no humano que expresa CD4 que comprende un epítipo de reactividad cruzada con CD4 humano de modo que sea reconocido por el anticuerpo monoclonal. Se ensayaron tres especies de primates no humanos diferentes, chimpancé, monos rhesus y cynomolgus para determinar la reactividad cruzada de epítipos CD4 con los 5 anticuerpos monoclonales humanos anti-CD4 diferentes de los hibridomas 1E11, 1G2, 6G5, 10C5 y 4D1. Se aislaron linfocitos de sangre periférica a partir de sangre completa de chimpancé, monos rhesus y cynomolgus. Se realizó una tinción doble de las células aisladas con anticuerpo humano de cada uno de estos 5 hibridomas (detectado con anti-IgG humana-FICT) y anti-CD8-PE o anti-CD4-PE. Las células teñidas se analizaron después por citometría de flujo para determinar si cada uno de los anticuerpos monoclonales humanos se unían a CD4 endógeno en la superficie de linfocitos de cada uno de estos tres primates no humanos. Se descubrió que cuatro de los cinco anticuerpos, 1E11, 6G5, 10C5 y 4D1 se unía a células CD4 de chimpancé. Además, se descubrió que cuatro de los cinco anticuerpos 6G5, 1G2, 10C5 y 4D1 se unían tanto a células CD4 de rhesus como de cynomolgus. Por lo tanto, tres de los cinco anticuerpos, 6G5, 10C5 y 4D1 se unen a células CD4 en cada una de las tres especies de primates no humanos ensayadas.

Ejemplo 44

No existen ensayos *in vitro* conocidos que puedan predecir de forma fiable si un anticuerpo monoclonal (mAb) producirá o no reducción o inmunodepresión en pacientes. Sin embargo, se ha observado una correlación entre la capacidad de tres mAb diferentes para producir reducción (o no) en seres humanos y primates no humanos tales como chimpancés y monos cynomolgus (véase, por ejemplo, M. Jonker *et al.*, Clin. Exp. Immunol., 93:301-307(1993); y J.A. Powelson *et al.*, Transplantation, 57: 788-793 (1994)). Por lo tanto, se realizó un estudio usando mAb humanos en primates no humanos.

30 Se usaron chimpancés en este estudio porque uno de los mAb anti-CD4 1E11, reconoce CD4 solamente en chimpancés y no en monos Rhesus o cynomolgus. Un segundo mAb, 6G5, reconoce CD4 en chimpancés, monos Rhesus y cynomolgus. Un tercer mAb, 1G2, no reconoce CD4 en chimpancés pero reconoce CD4 en monos Rhesus o cynomolgus. Se ha demostrado ya que ese mAb no produce reducción *in vivo* en monos cynomolgus.

35 Además de examinar el efecto de mAb humanos sobre los números de células T CD4+ en sangre periférica, también se evaluó el efecto de la administración de mAb sobre la función de células T *in vivo*. La forma más aceptada de hacer esto era usar animales que se habían sensibilizado previamente con un antígeno tal como tuberculina o toxoide tetánico y que montaría una reacción de hipersensibilidad en la piel.

40 Se incorporaron al estudio tres chimpancés macho. Se obtuvieron muestras de sangre completa basales los días -7, -3 y 1. Después de la extracción de sangre el día 1, a cada uno de los chimpancés se le infundió por vía intravenosa uno de los dos mAb humanos (1E11 o 6G5) a 2 mg/kg. El tercer chimpancé recibió un volumen equivalente/kg de tampón solamente. Se extrajo sangre a los 30 min, 2 h, 8 h, 24 h y 48 h después de la infusión. El día 2 se realizó un ensayo de reactividad cutánea.

45 Los resultados mostrados en la Tabla 25 a continuación demuestran claramente que 1E11 causaba una reducción transitoria de los linfocitos periféricos, reduciéndose la mayoría de células T CD4+. Aun cuando 6G5 no causaba reducción de células T CD4+ o linfocitos, ambos mAb eran capaces de inhibir una respuesta de hipersensibilidad a toxoide tetánico en comparación con el chimpancé de control. Por lo tanto, ambos mAb humanos parecen ser inmunosupresores *in vivo* y esta inmunosupresión no requiere necesariamente reducción del número de células T.

TABLA 25

Efecto de mAb Humanos sobre Linfocitos Periféricos de Chimpancé

Linfocitos Periféricos (millón/ml)			
Día de Estudio	1E11	6G5	Control
-7	4,2	6,4	4,2
-4	4,0	9,9	4,4
1, pre-infusión	4,8	5,7	5,8
1, 30 min pos-infusión	1,6	6,0	4,0

ES 2 345 580 T3

Linfocitos Periféricos (millón/ml)

	Día de Estudio	1E11	6G5	Control
5	1, 2 h pos- infusión	1,0	6,7	5,2
10	1, 6 h pos- infusión	1,5	8,0	4,2
	2	3,5	9,6	5,7
15	3	3,9	9,7	5,9
20				
25				
30				
35				
40				
45				
50				
55				
60				
65				

REIVINDICACIONES

1. Inmunoglobulina de secuencia humana que se une a proteína CD4 humana que comprende un segmento VH4-
5 34, un segmento JH5 y una región CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia polipeptídica VINWFDP.

2. Inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con la reivindicación 1, en la cual dicha inmunoglobulina comprende una secuencia polipeptídica de cadena pesada sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica
10 codificada por:

a)

15

TGCACAAGAACATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTG
GCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGT
20 GGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCA
CCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAG
CTGGATCCGCCAGCCCCAGGTAAGGGGCTGGAGTGGATTGG
25 GGAAATCAATCATAGTGAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCA
AGAGTCGAGTCACCATATCAGTCGACACGTCCAAGAACCAGTT
CTCCCTGAAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTG
TACTACTGTGCGAGAGTAATTAATTGGTTCGACCCCTGGGGCCA
30 GGAACCCTGGTCACC,

35

o

b)

40

AAGCTTGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGT
GGCAGCTCCTAGATGGGTCCTGTCTCAGGTGCAGCTACAGCAG
45 TGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCA
CCTGCGCTGTCTATGGTGGTTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAG
CTGGATCCGCCAGCCACCAGGTAAGGGTCTGGAGTGGATTGGT
GAAATCAATCATAGTGAAGCACCAACTACAACCCGTCTCTCAA
50 GAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCT
CTCTGAAACTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCTGTGTA
TTACTGTGCGAGAGTAATTAATTGGTTCGACCCCTGGGGCCAG
55 GGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCAACCAAGGGCCCAT
CGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG
CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
60 CCGGT.

65

3. Inmunoglobulina de la secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende además un
segmento VkL19, un segmento Jk2 y una región CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia polipeptídica
QQANSFPYT.

ES 2 345 580 T3

4. Inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con la reivindicación 3, en la cual dicha inmunoglobulina comprende una secuencia polipeptídica de cadena ligera sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por:

5 a)

10 **GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATT
TTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAATAGTTTCCCGTACACTT**

15 **TTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGC
ACCATCTGTCTTCATCTTCCC,**

20 o

b)

25 **AAGCTTGCCACCATGATGGTCCCAGCTCAGCTCCTCGGTCTCC
TGCTGCTCTGGTTCCCAGGTTCCAGATGCGACATCCAGATGAC
CCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA
30 CCATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGATATTAGCAGCTGGTTAGC
CTGGTATCAGCATAAACCAGGTAAGCACCTAAGCTCCTGATCT
ATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGTGTCCCATCAAGGTTCCAGC
GGAAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCC
35 TGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAAT
AGTTTCCCGTACACTTTTGGTCAGGGAACCAAGCTGGAGATCAA
ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC.**

40

5. Inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha inmunoglobulina comprende una secuencia polipeptídica de una cadena pesada idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por:

45

a)

50 **TGCACAAGAACATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTG
GCAGCTCCCAGATGGGTCTGTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGT
GGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCA
55 CCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTTCAGTGGTTACTACTGGAG
CTGGATCCGCCAGCCCCAGGTAAGGGGCTGGAGTGGATTGG
GGAAATCAATCATAGTGGAAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCA
AGAGTCGAGTCACCATATCAGTCGACACGTCCAAGAACCAGTT
60 CTCCCTGAAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTG
TATTACTGTGCGAGAGTAATTAATTGGTTCGACCCCTGGGGCCA
GGGAACCCTGGTCACC,**

65

o

b)

5 AAGCTTGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGT
 GGCAGCTCCTAGATGGGTCTGTCTCAGGTGCAGCTACAGCA
 TGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCA
 10 CCTGCGCTGTCTATGGTGGTTCTTCAGTGGTTACTACTGGAG
 CTGGATCCGCCAGCCACCAGGTAAGGGTCTGGAGTGGATTGGT
 GAAATCAATCATAGTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCTCTCAA
 GAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCT
 15 CTCTGAAACTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCTGTGTA
 TACTGTGCGAGAGTAATTAATTGGTTCGACCCTTGGGGCCAG
 GGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCAACCAAGGGCCCAT
 CGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG
 20 CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
 CCGGT;

25 y en la cual la inmunoglobulina de secuencia humana comprende además un segmento VkL19, un segmento Jk2 y una secuencia polipeptídica de cadena ligera idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por:

a)

30 GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATT
 TTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAATAGTTTCCCGTACACTT
 35 TTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGC
 ACCATCTGTCTTCATCTTCCC,

o

40 b)

45 AAGCTTGCCACCATGATGGTCCCAGCTCAGCTCCTCGGTCTCC
 TGCTGCTCTGGTTCACAGGTTCCAGATGCGACATCCAGATGAC
 CCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA
 CCATCACTTGTGCGGGCGAGTCAGGATATTAGCAGCTGGTTAGC
 50 CTGGTATCAGCATAAACCAGGTAAGCACCTAAGCTCCTGATCT
 ATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGTGTCCCATCAAGGTTGAGC
 GGAAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCC
 TGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAAT
 55 AGTTTCCCGTACACTTTTGGTCAGGGAACCAAGCTGGAGATCAA
 ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC.

60 6. Inmunoglobulina de la secuencia humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que tiene una constante de avidez (K_a) de al menos $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.

7. Inmunoglobulina de la secuencia humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que tiene una constante de avidez (K_a) de al menos $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$.

65 8. Inmunoglobulina de la secuencia humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que tiene una constante de avidez (K_a) de al menos $1,1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$.

ES 2 345 580 T3

9. Gen artificial que codifica un polipéptido de una cadena pesada de la inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2.
10. Vector de expresión que codifica un polipéptido de una cadena pesada de la inmunoglobulina de secuencia humana como se define de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2.
11. Vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 10 que codifica además un polipéptido de una cadena ligera de la inmunoglobulina de secuencia humana como se define de acuerdo con las reivindicaciones 3 ó 4.
12. Célula que comprende un gen artificial que codifica un polipéptido de una cadena pesada de la inmunoglobulina de secuencia humana como se define de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 y un gen artificial que codifica un polipéptido de una cadena ligera de la inmunoglobulina de secuencia humana como se define de acuerdo con las reivindicaciones 3 ó 4.
13. Célula de acuerdo con la reivindicación 12, en la que los dos genes artificiales están en un solo vector.
14. Composición que comprende la inmunoglobulina de secuencia humana de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
15. Procedimiento para expresar un polipéptido de inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 que implica:
- la inserción de un ácido nucleico sintético que codifica una región de una inmunoglobulina en un vector que codifica los segmentos o partes restantes de la cadena de inmunoglobulina y
 - la introducción de dicho vector en una célula.
16. Procedimiento para expresar un polipéptido de inmunoglobulina de secuencia humana que comprende:
- introducir un gen artificial que codifica un polipéptido de una cadena pesada de la inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 y un gen artificial que codifica un polipéptido de una cadena ligera de inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 3 ó 4 en la misma célula; o
 - introducir un gen artificial que codifica un polipéptido de una cadena pesada de la inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 en una célula que se ha modificado por ingeniería genética para expresar el producto de un gen artificial que codifica un polipéptido de una cadena ligera de la inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 3 ó 4; o
 - introducir un gen artificial que codifica un polipéptido de una cadena ligera de la inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 3 ó 4 en una célula que se ha modificado por ingeniería genética para expresar el producto de un gen artificial que codifica un polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2.
17. Inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como producto farmacéutico.
18. Inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en la reducción de la actividad de células CD4.
19. Inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de la inmunosupresión.
20. Inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de reacciones autoinmunes.
21. Inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de respuestas inflamatorias.
22. Inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento del rechazo de órganos trasplantados.
23. Inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.
24. Inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de micosis fungoide.

ES 2 345 580 T3

25. Composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8.

5 26. Uso *in vitro* de una inmunoglobulina de secuencia humana de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 para diagnóstico.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

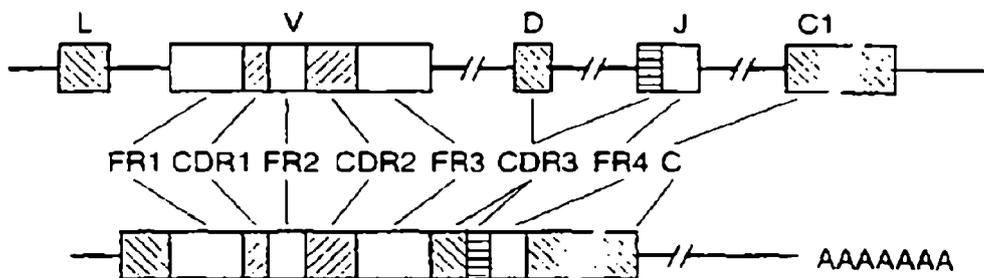


FIG. 1

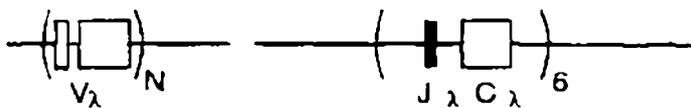


FIG. 2

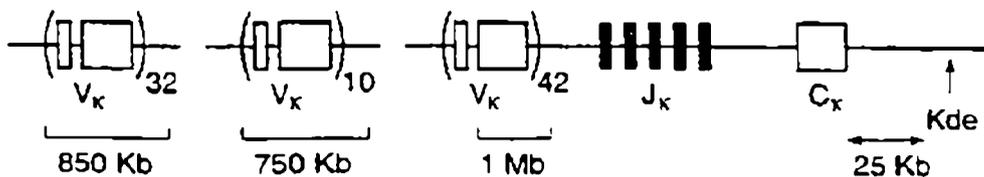


FIG. 3

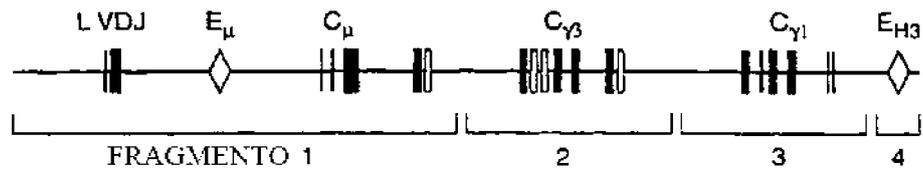


FIG. 5

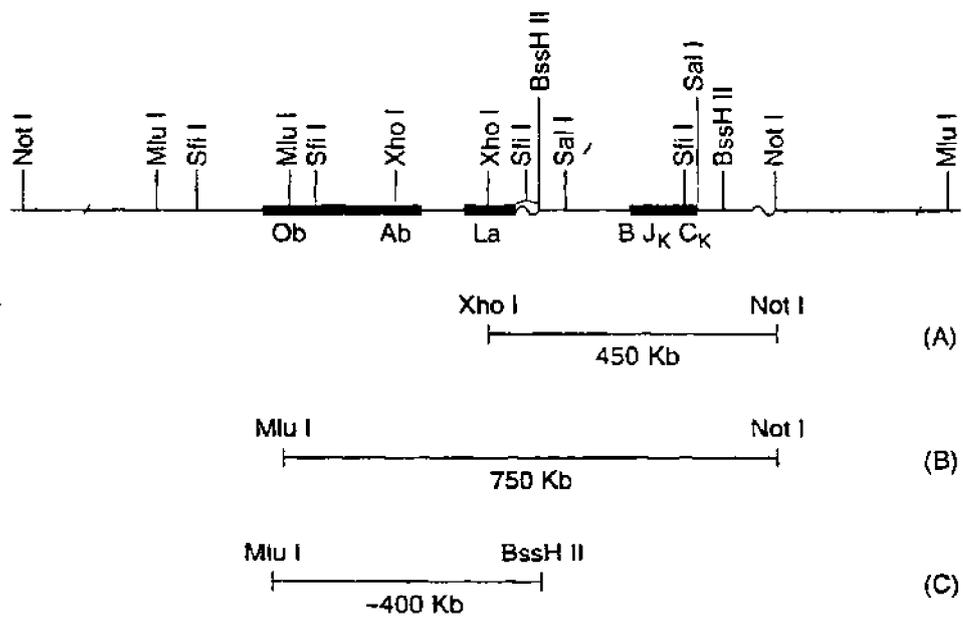


FIG. 6

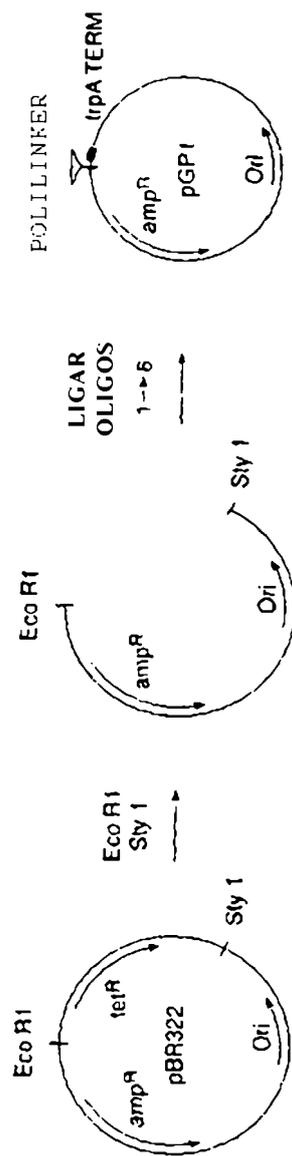


FIG. 7

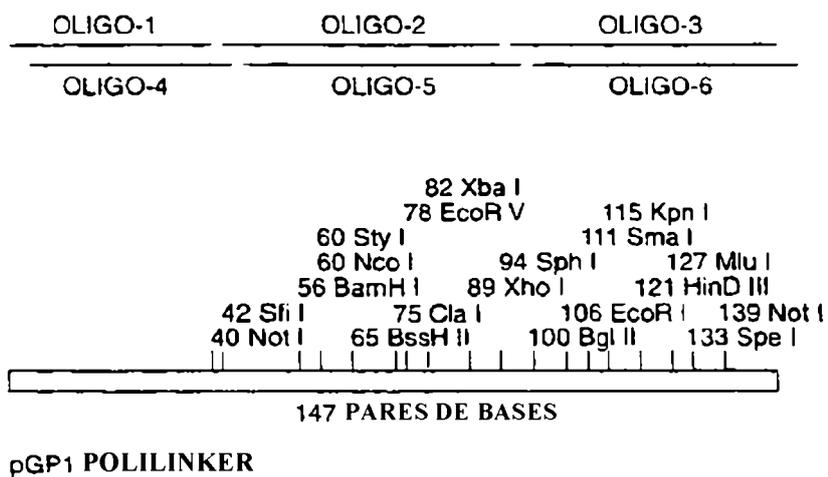
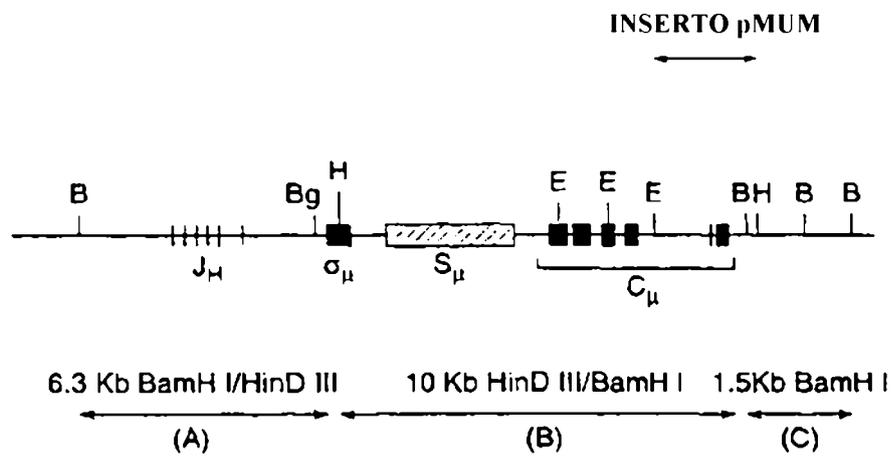


FIG. 8



μ LOCUS HUMANO

FIG. 9

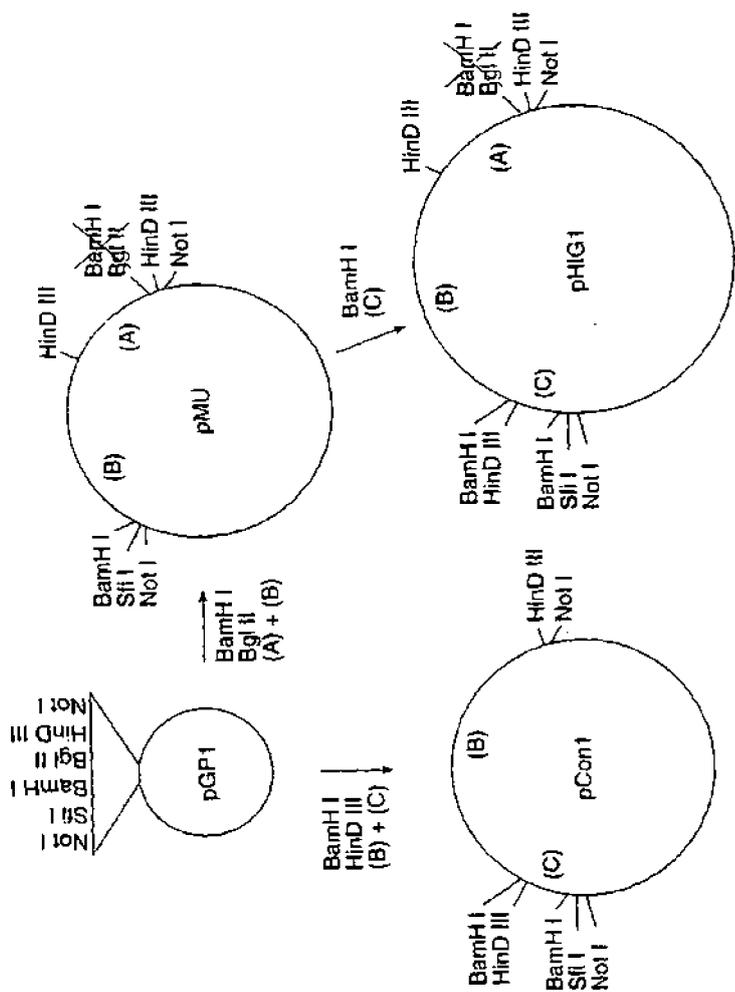


FIG. 10

GEN C_{γ1} HUMANO

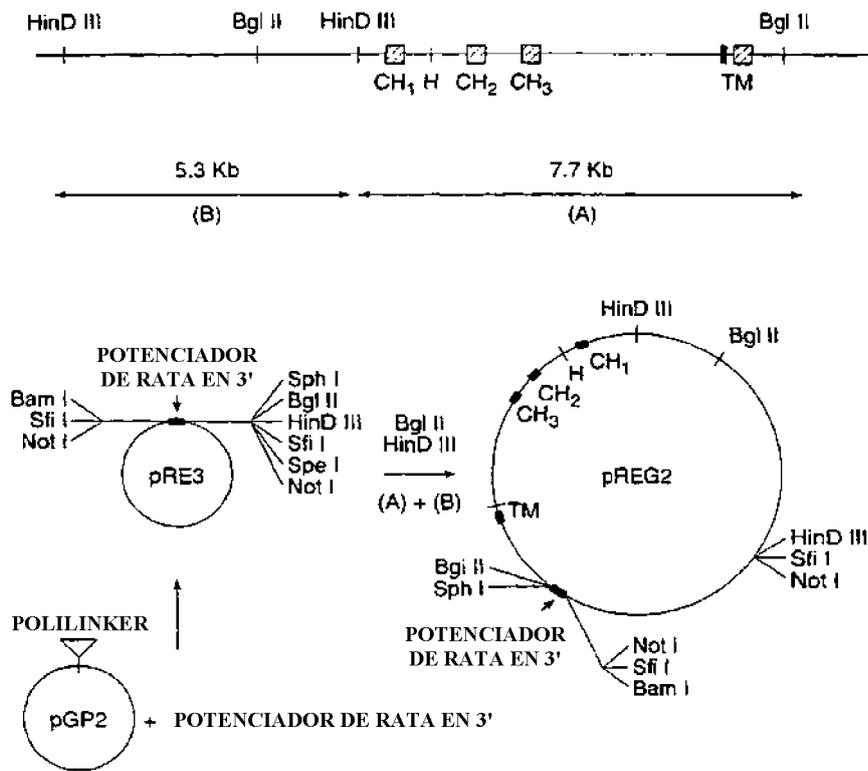


FIG. 11

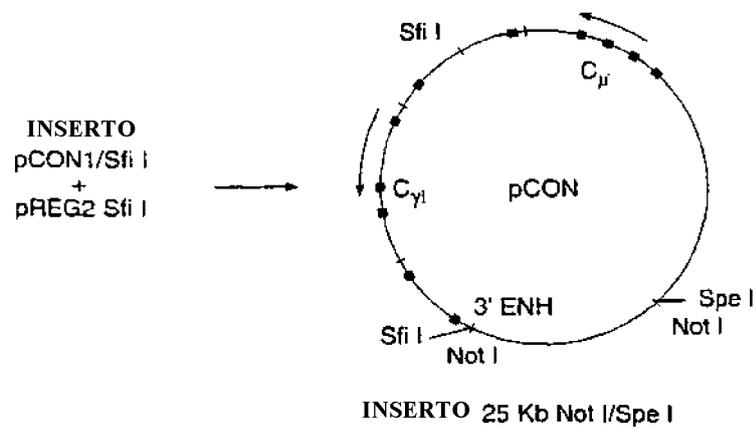
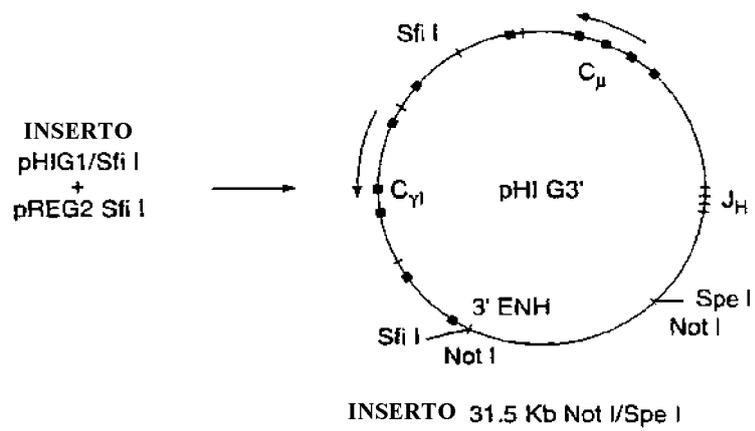


FIG. 12

REGIÓN D HUMANA

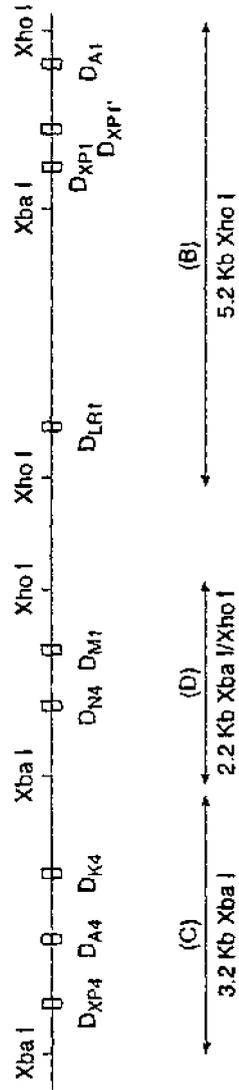


FIG. 13

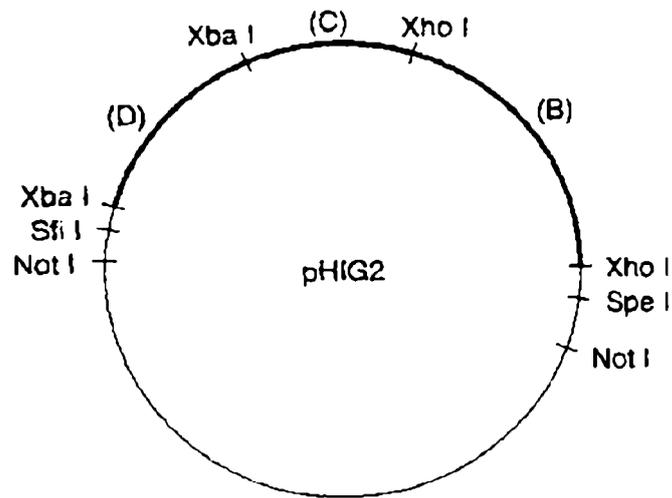


FIG. 14

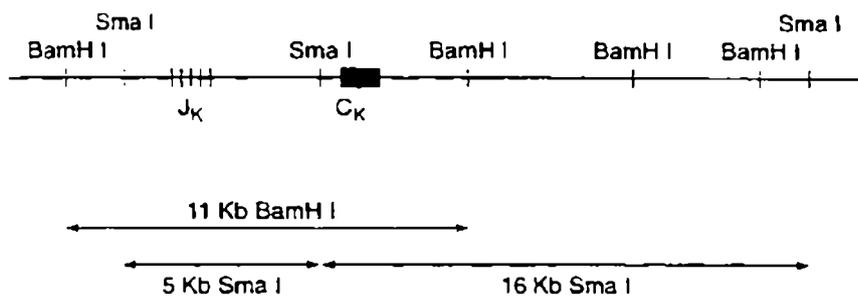


FIG. 15

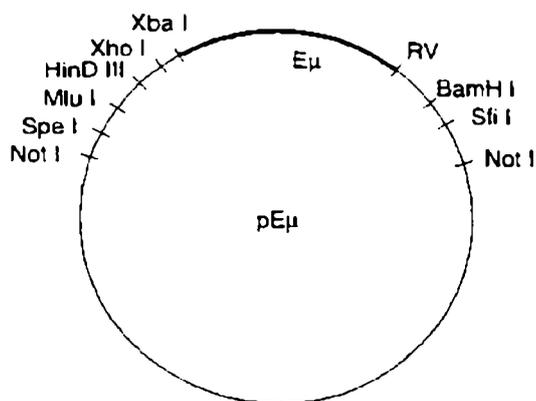


FIG. 16

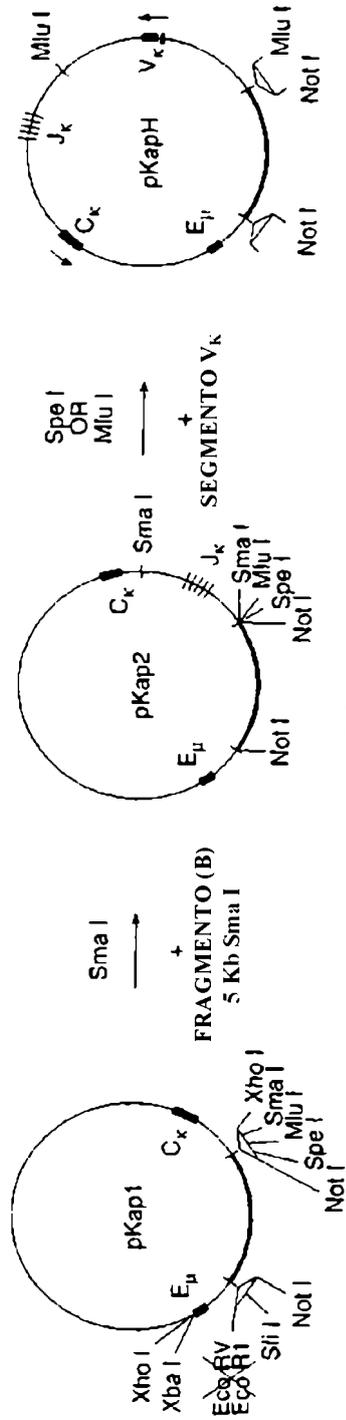


FIG. 17

LOCUS DE LA CADENA PESADA DE RATÓN

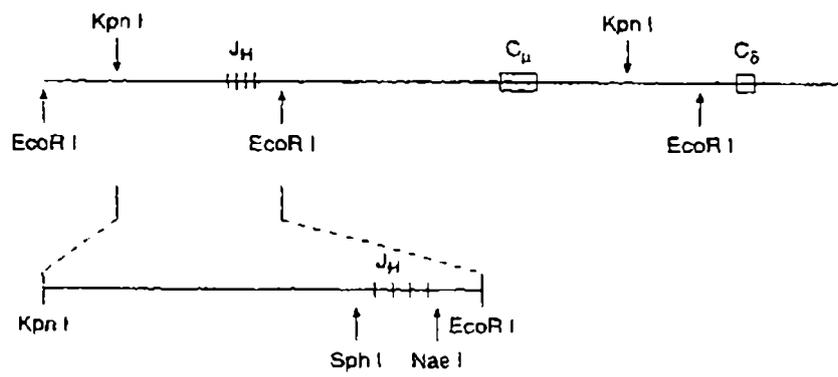


FIG. 18A

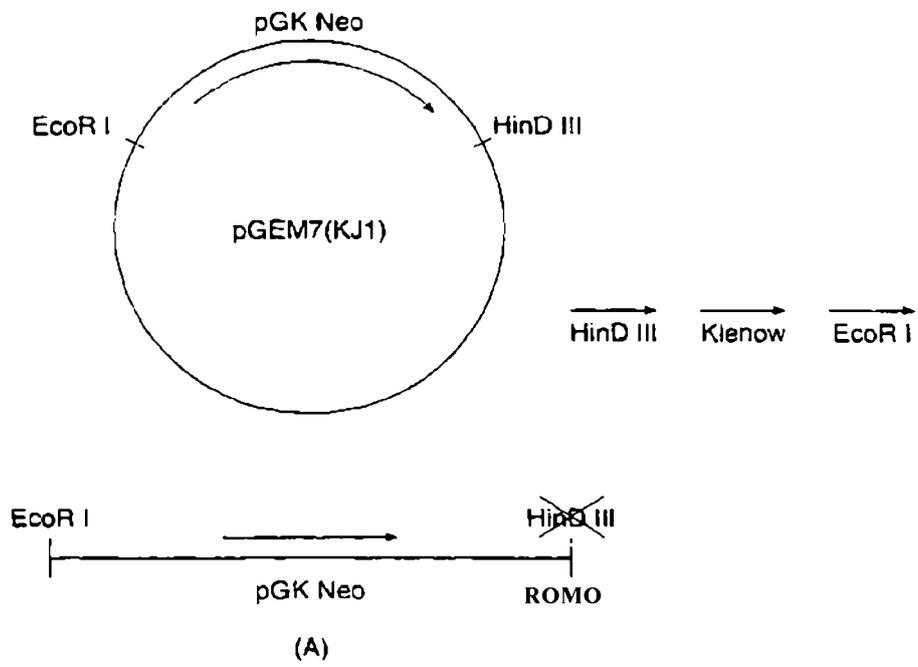


FIG. 18B

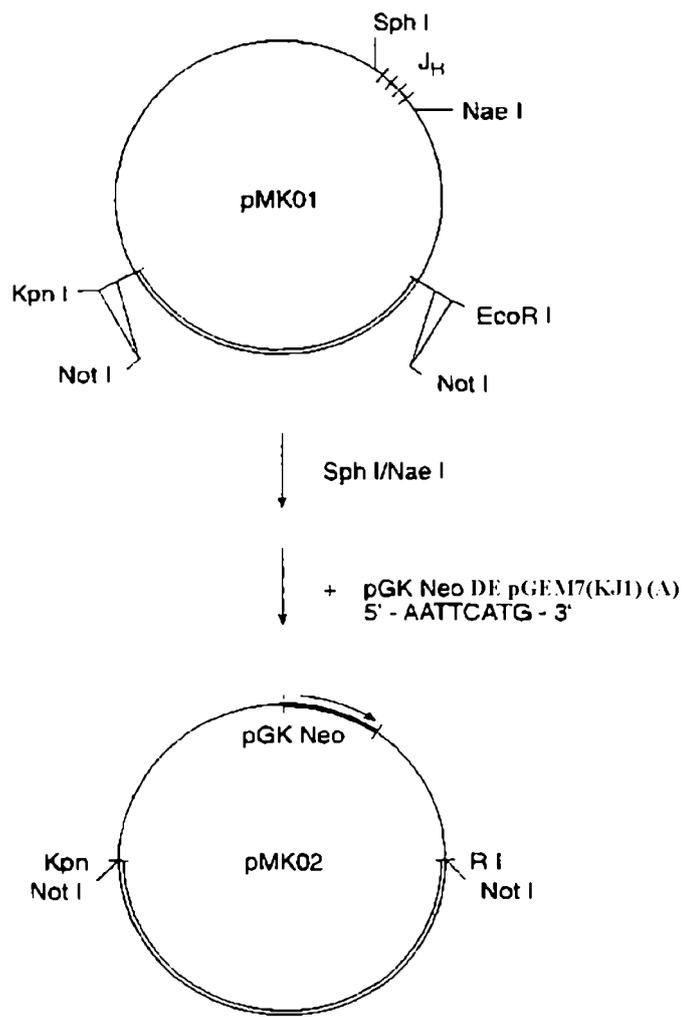


FIG. 18C

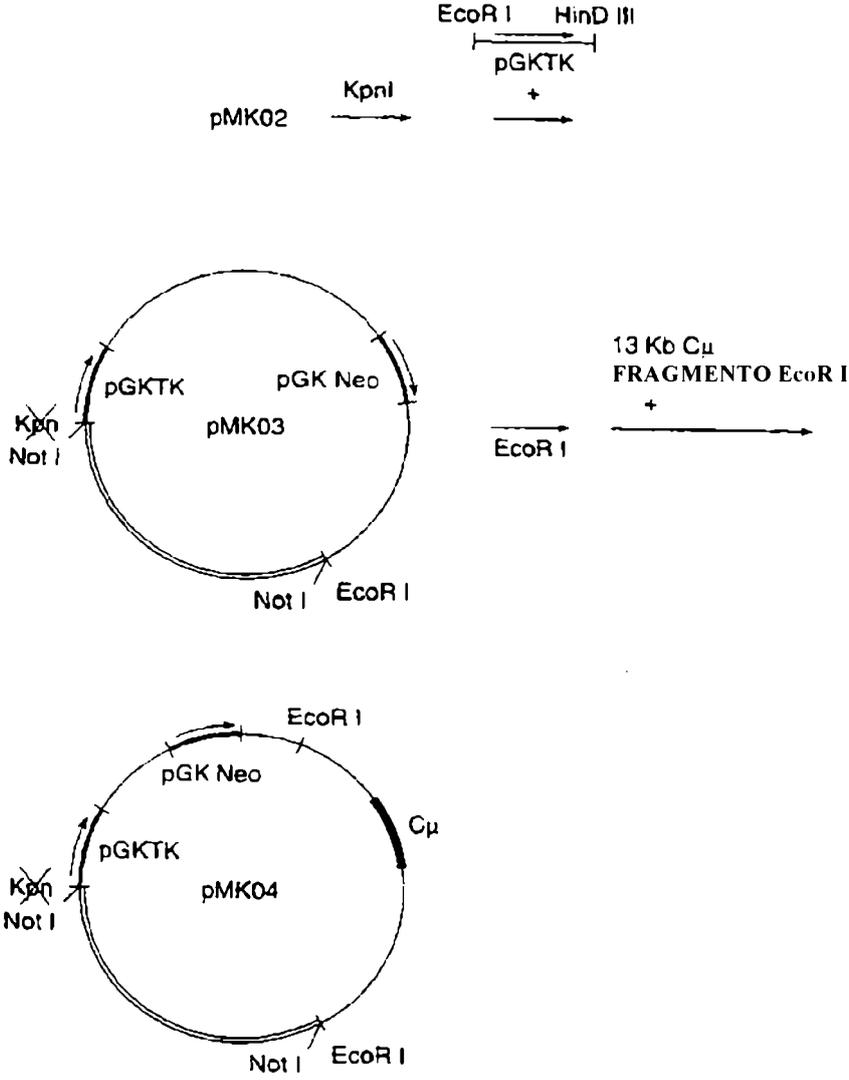


FIG. 18D

GEN KAPPA DE RATÓN

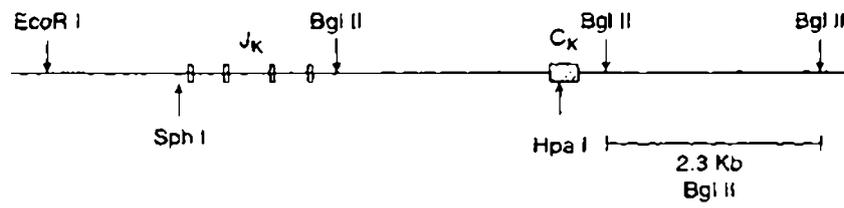


FIG. 19A

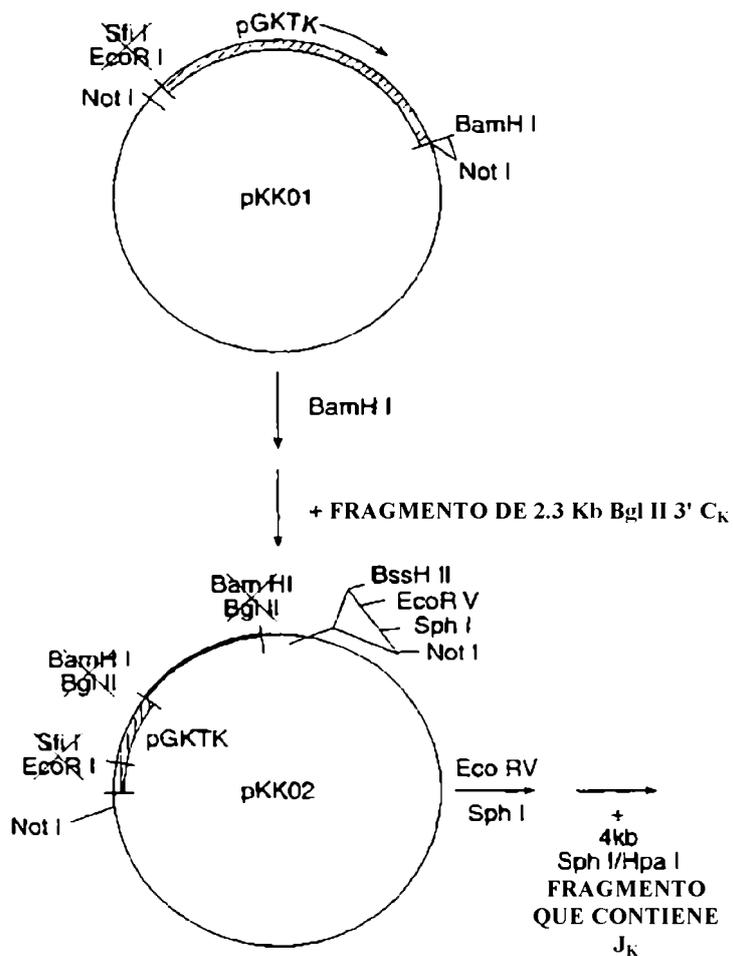


FIG. 19B

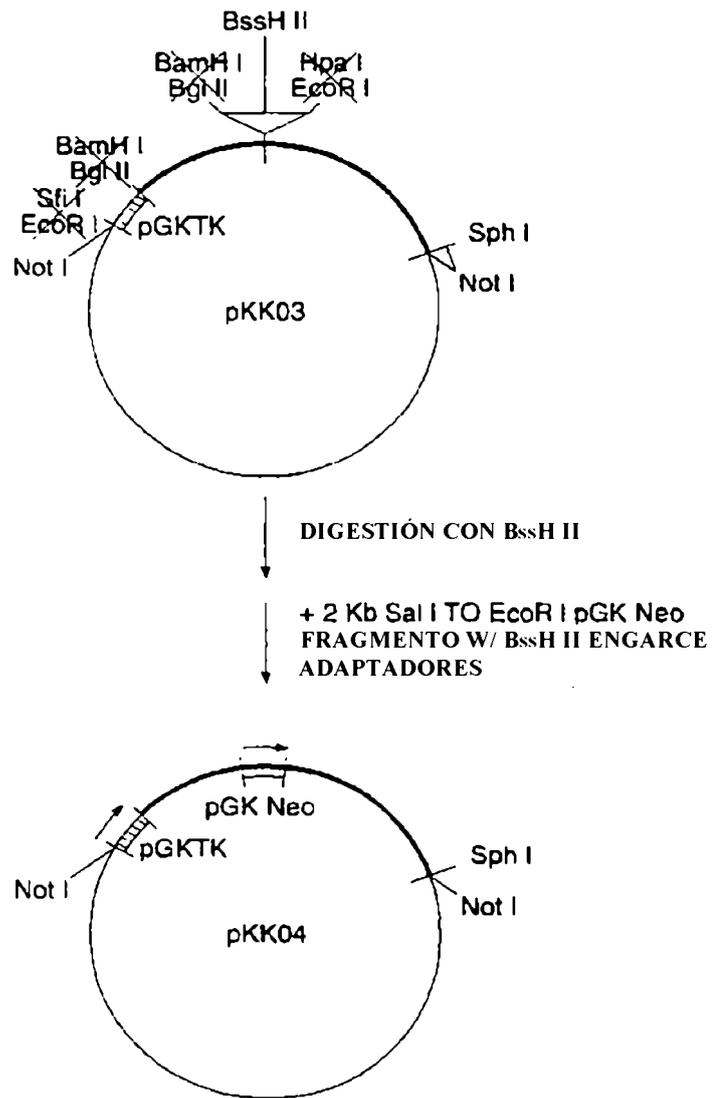


FIG. 19C

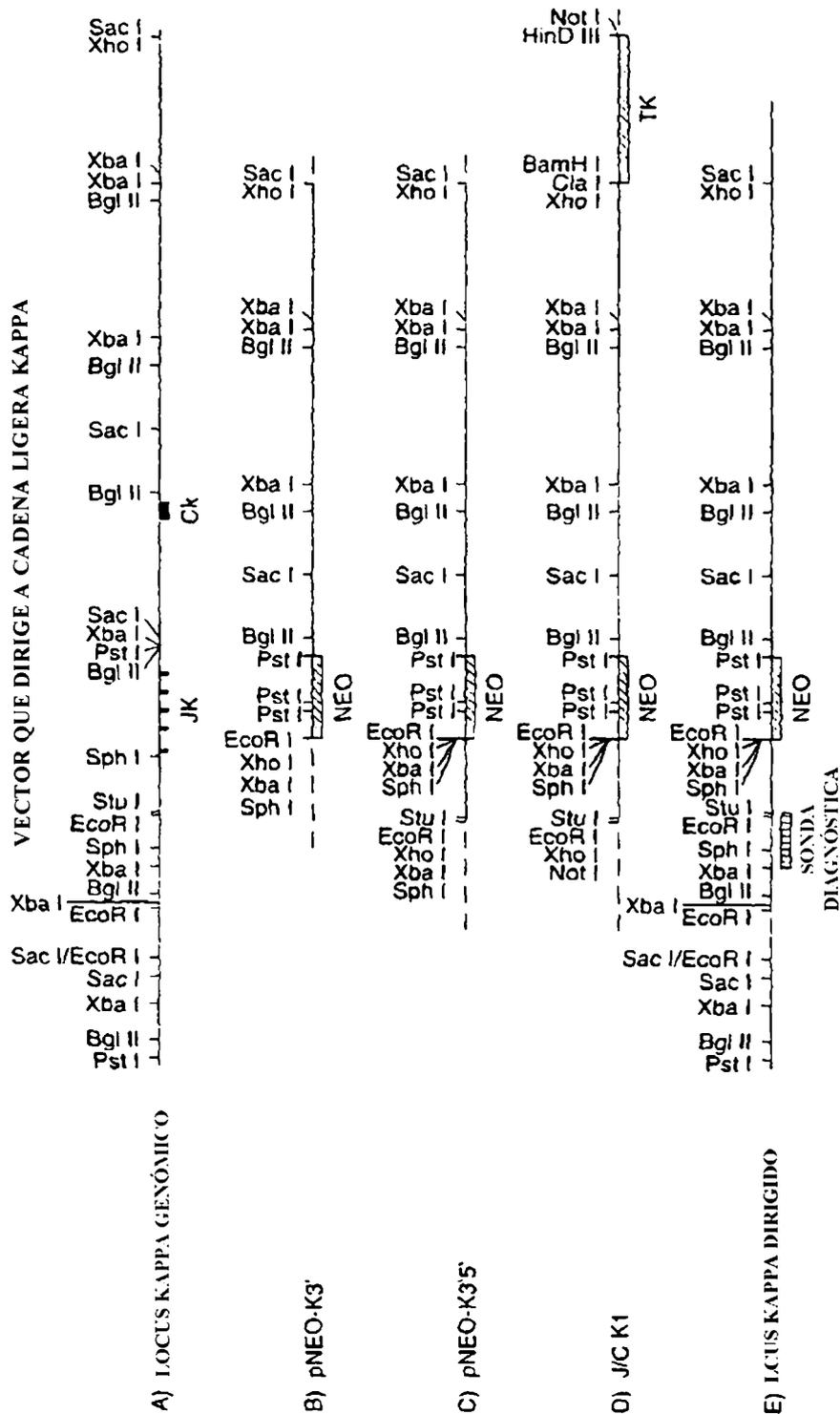


FIG. 20

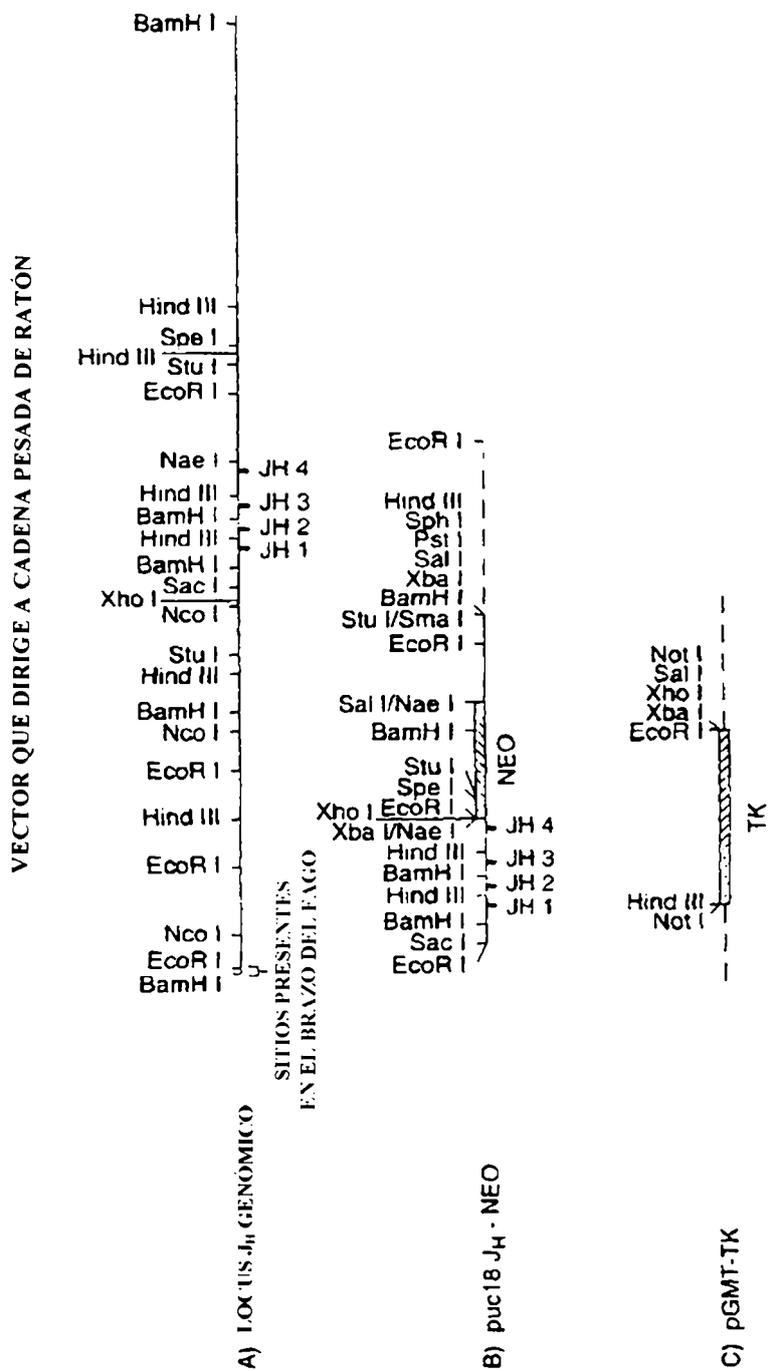


FIG. 21A-C

VECTOR QUE DIRIGE A CADENA PESADA DE RATÓN

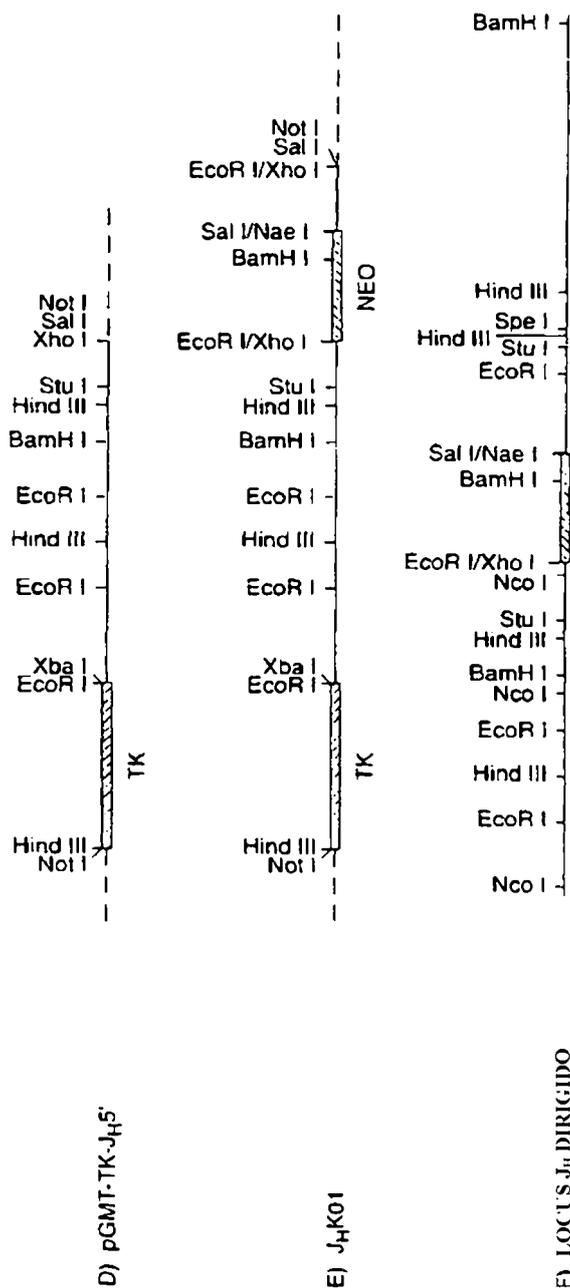


FIG. 21D-F

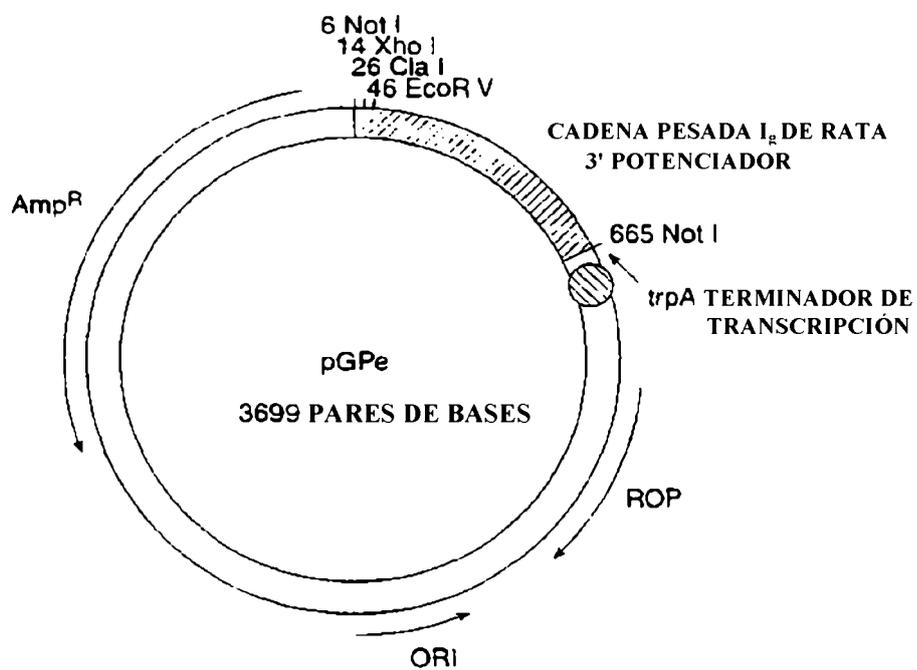


FIG. 22

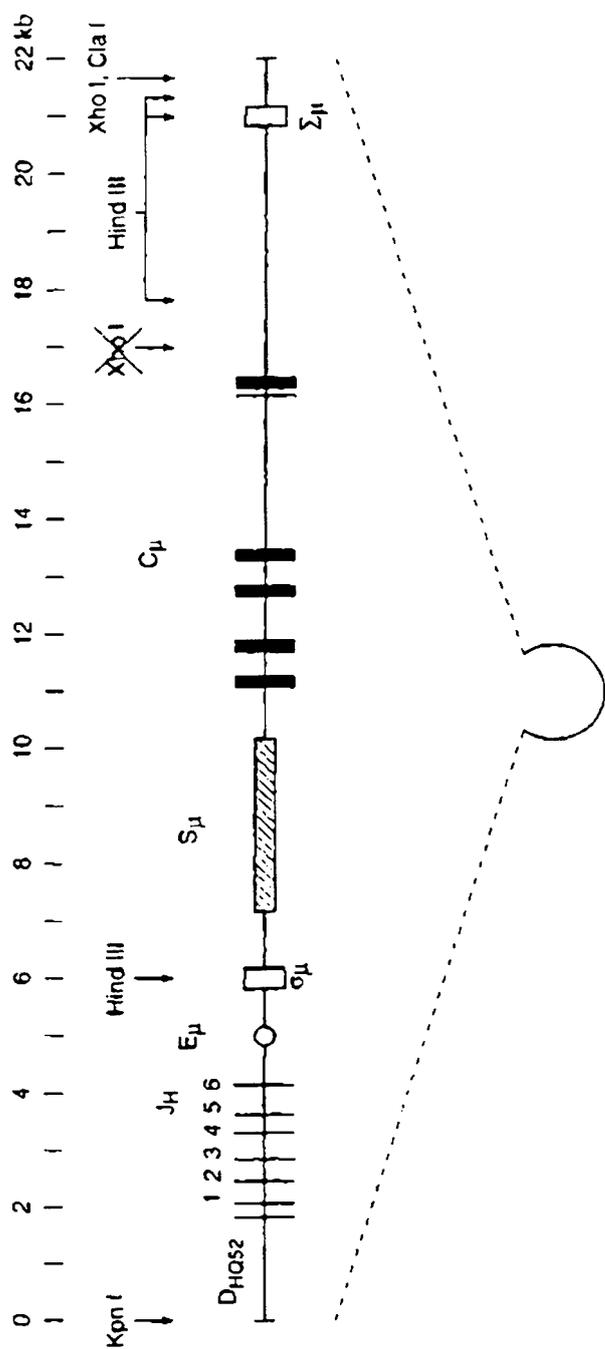


FIG. 23

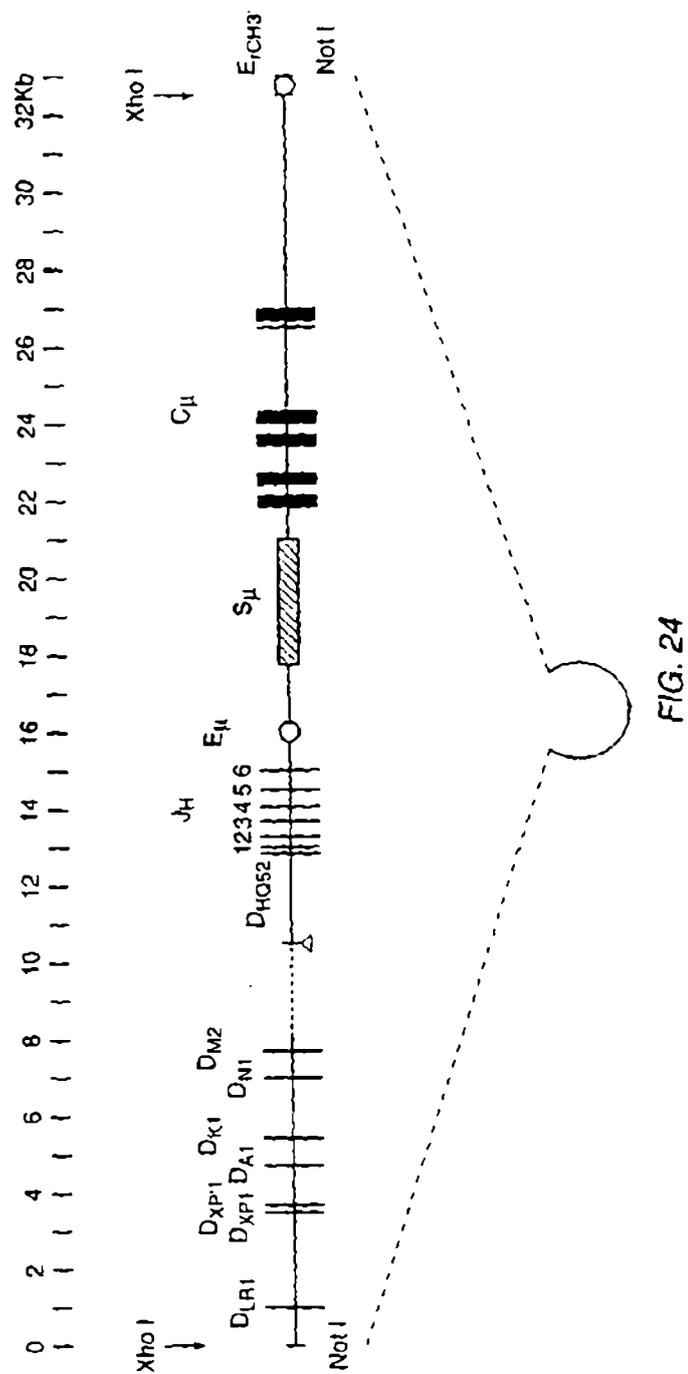


FIG. 24

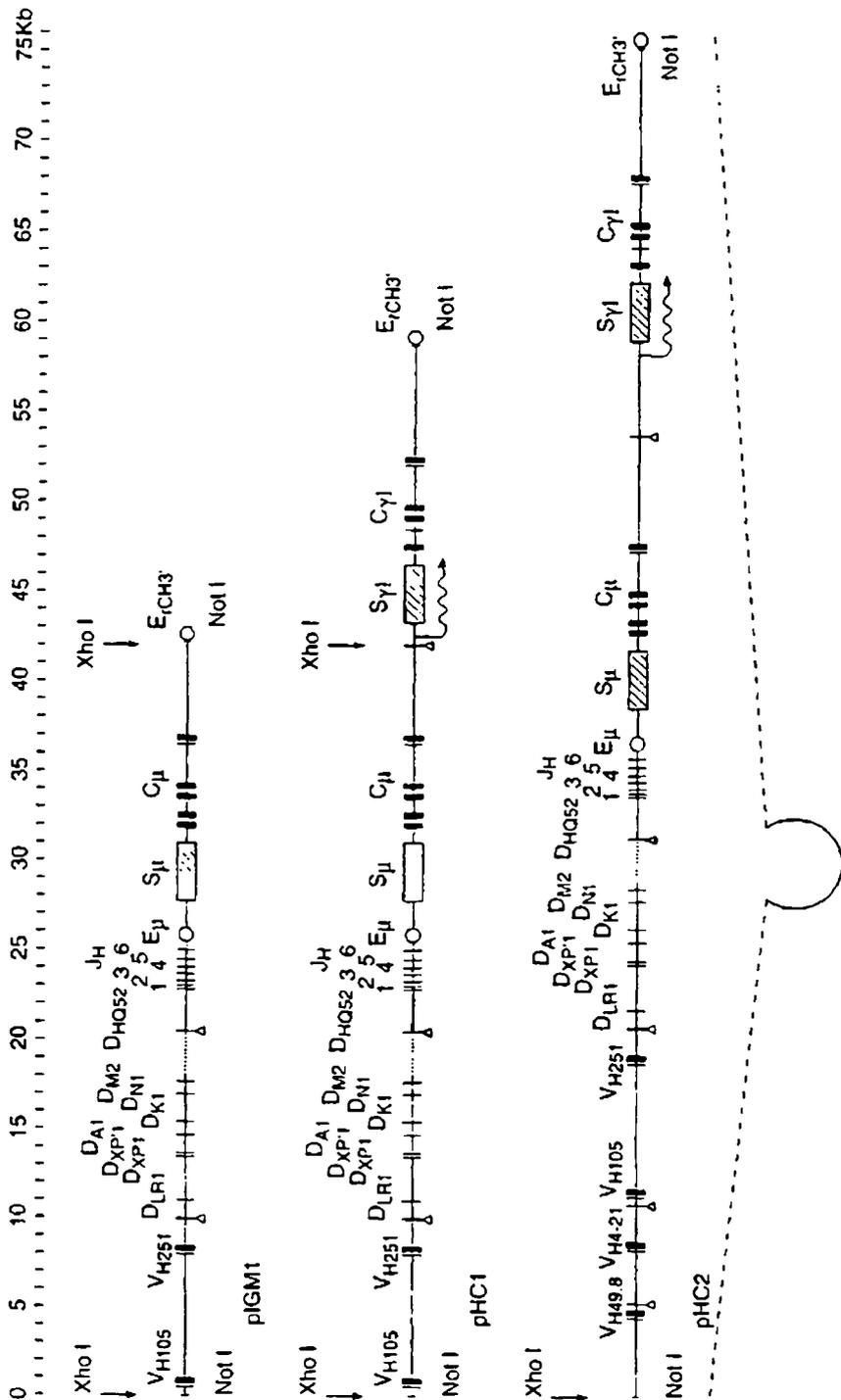


FIG. 25

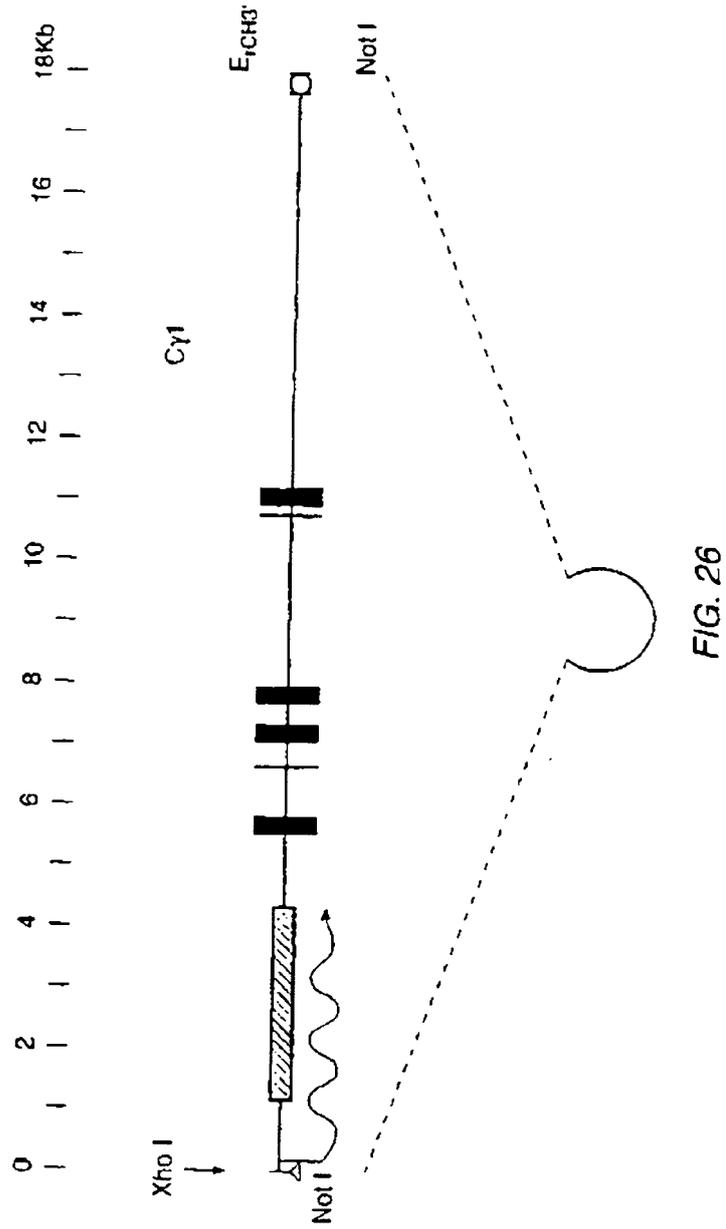


FIG. 26

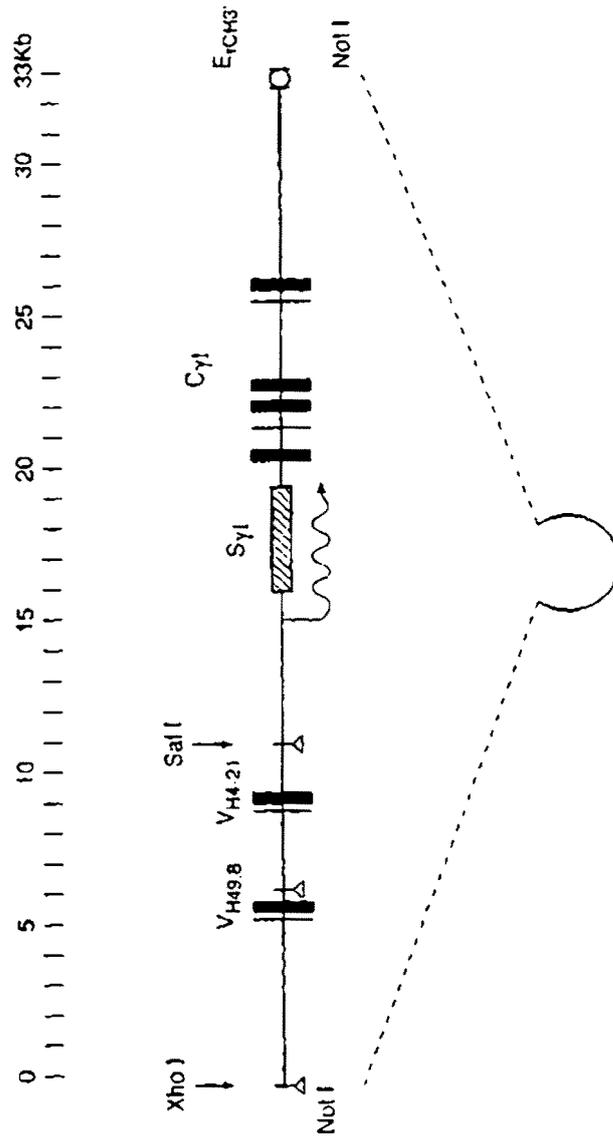
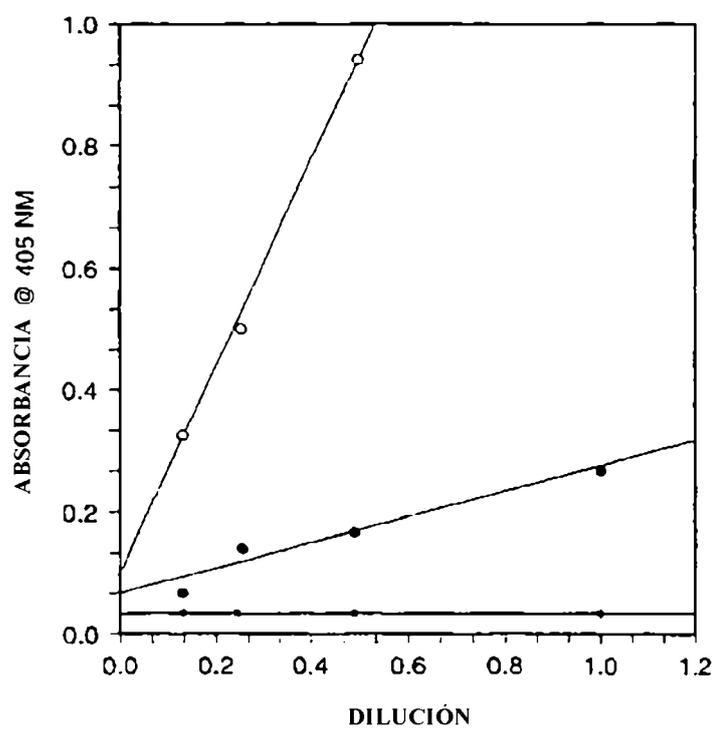


FIG. 27



○ IgM } pHC1 TRANSGÉNICO
● IgG1 }
× IgM } CONTROL NO TRANSGÉNICO
+ IgG1 }

FIG. 28

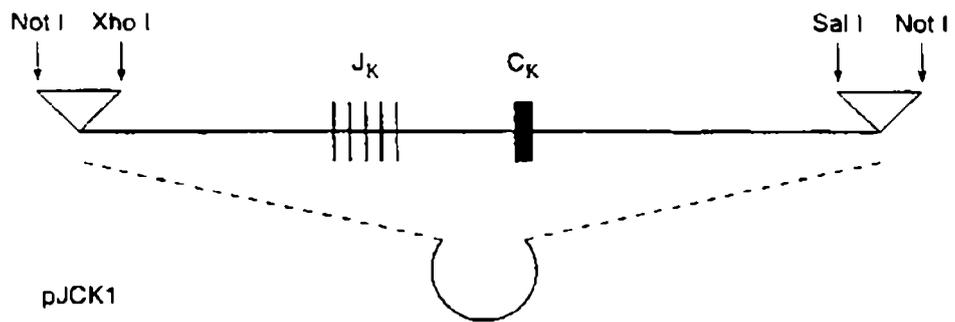
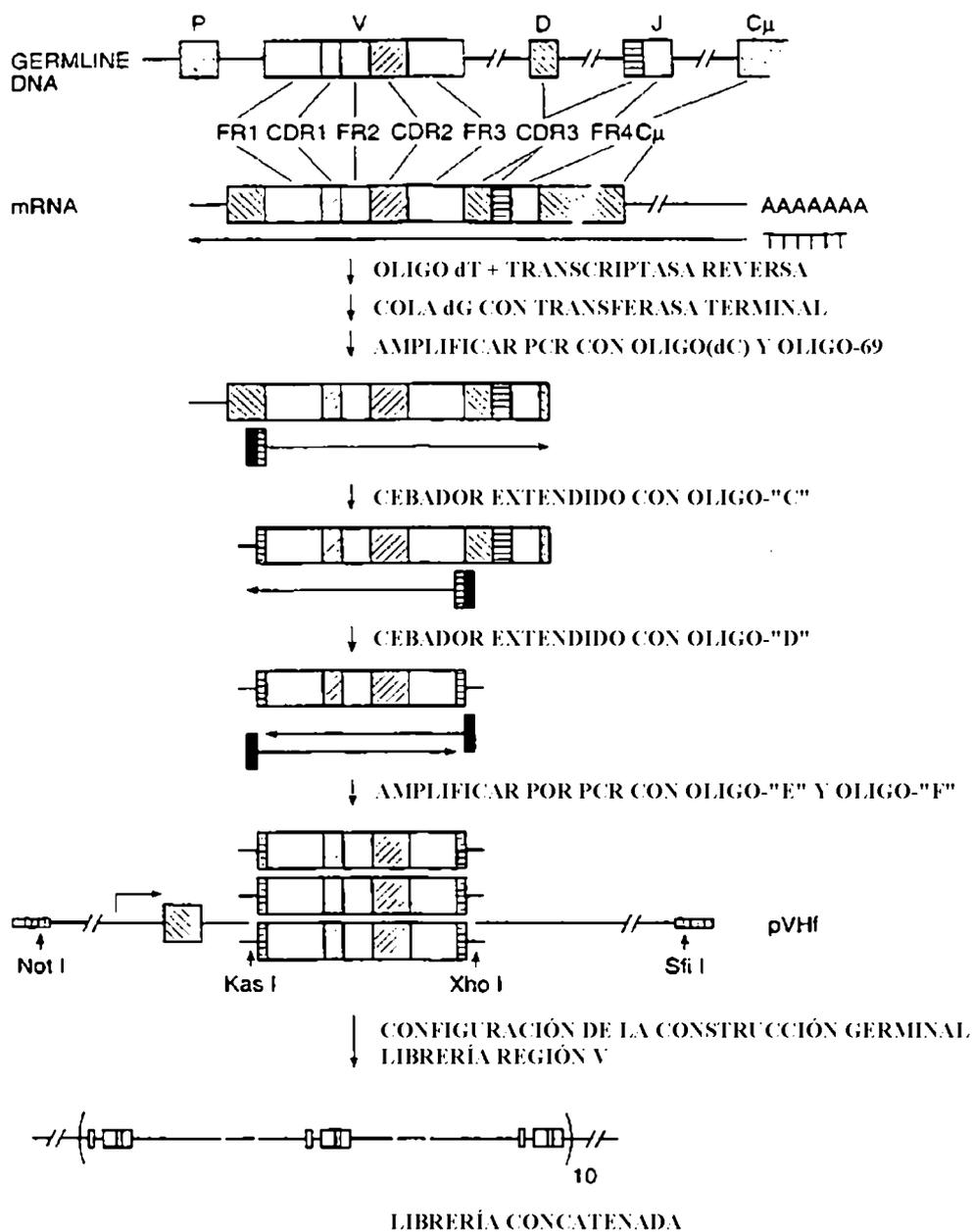


FIG. 29



REGIÓN VARIABLE SINTÉTICA DE LA CADENA PESADA

FIG. 30

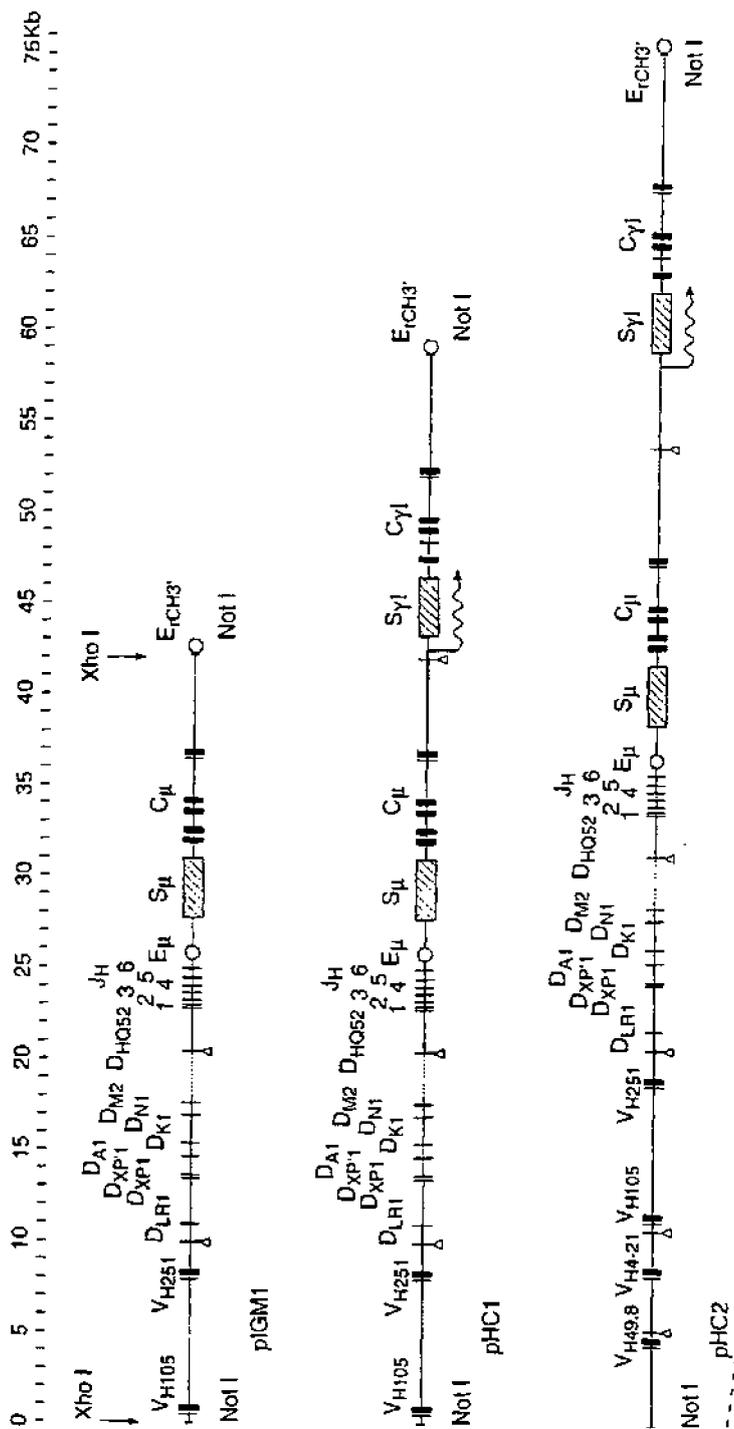


FIG. 31

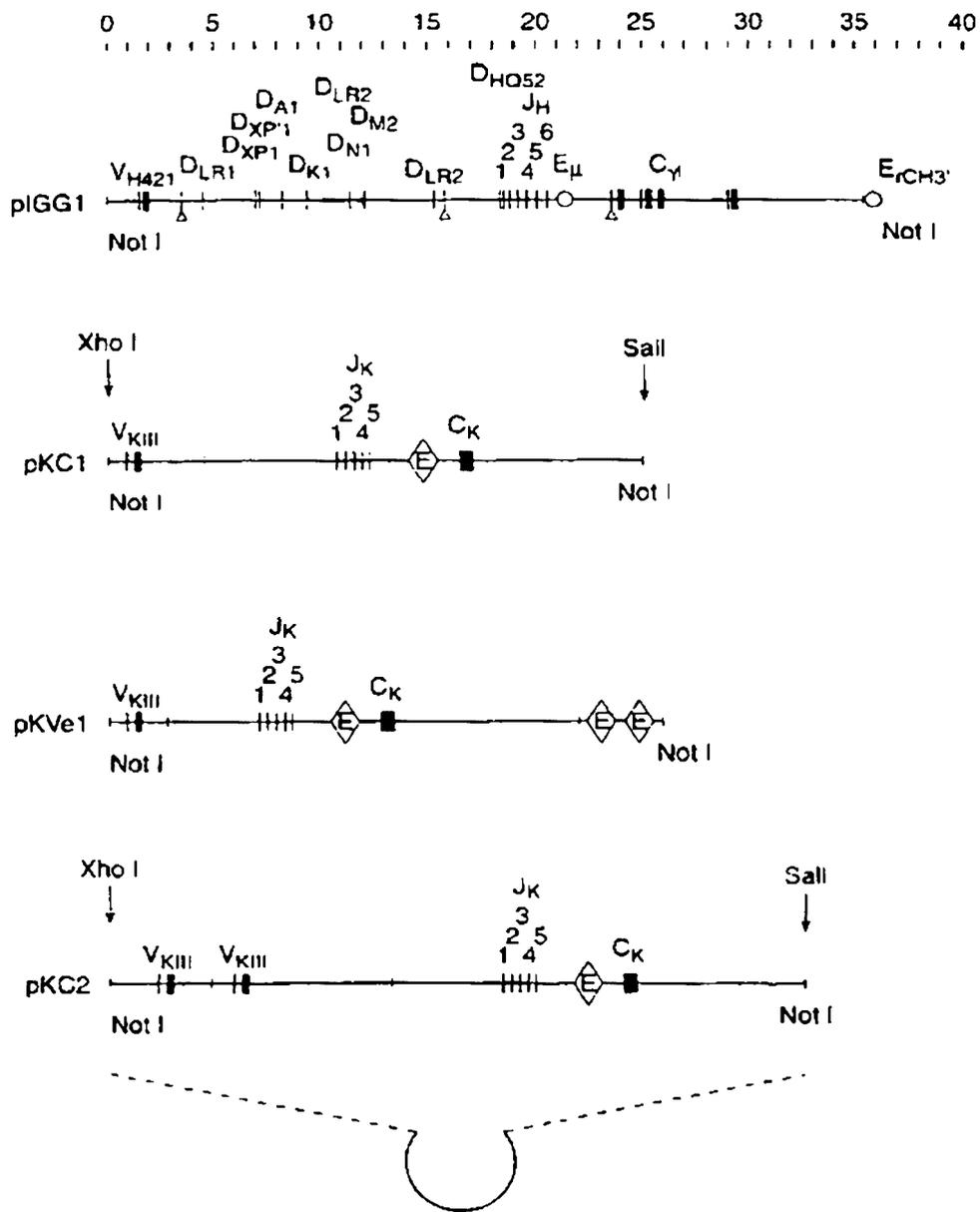


FIG. 32

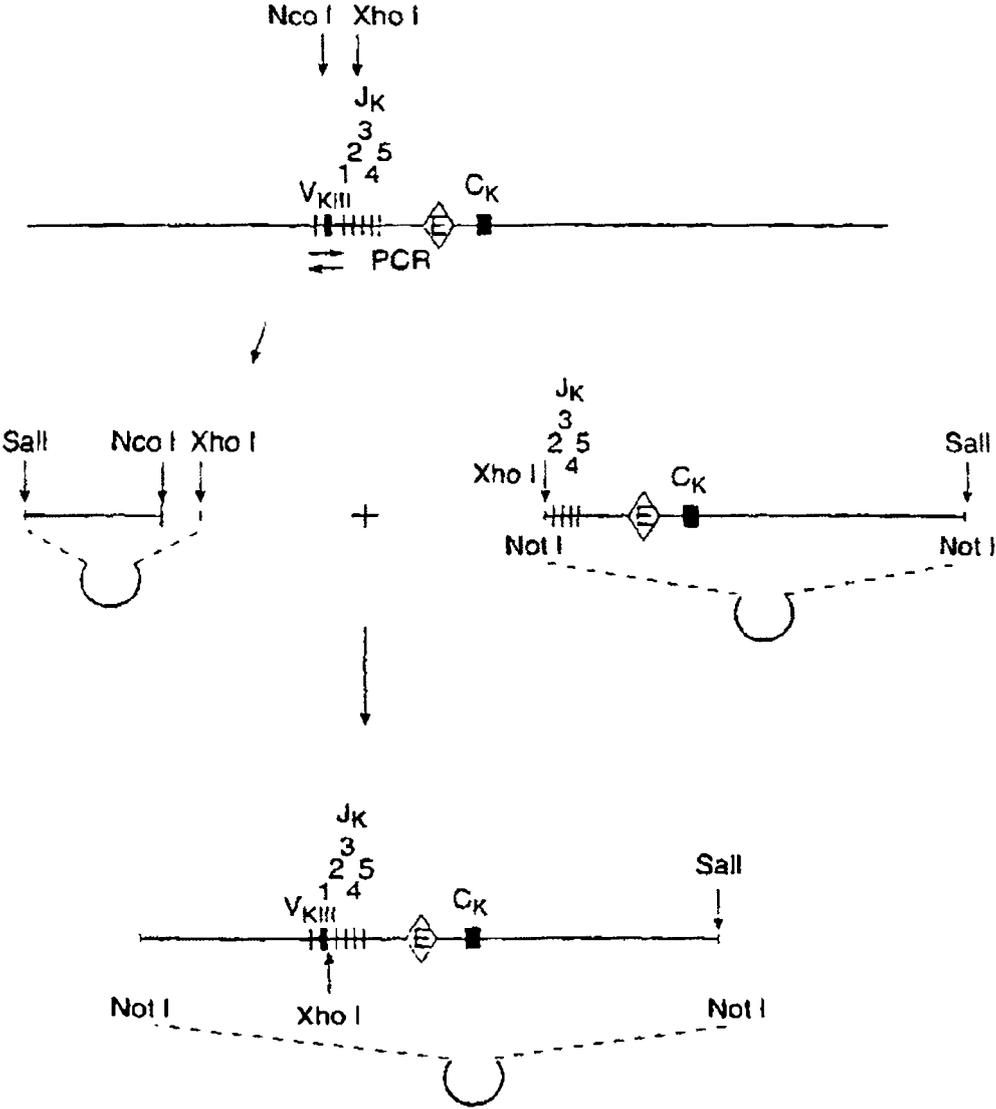


FIG. 33

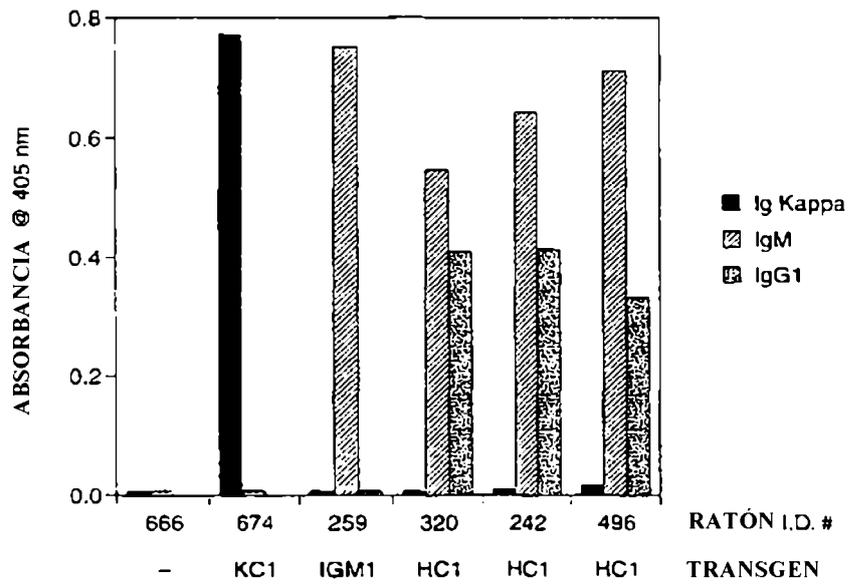


FIG. 34

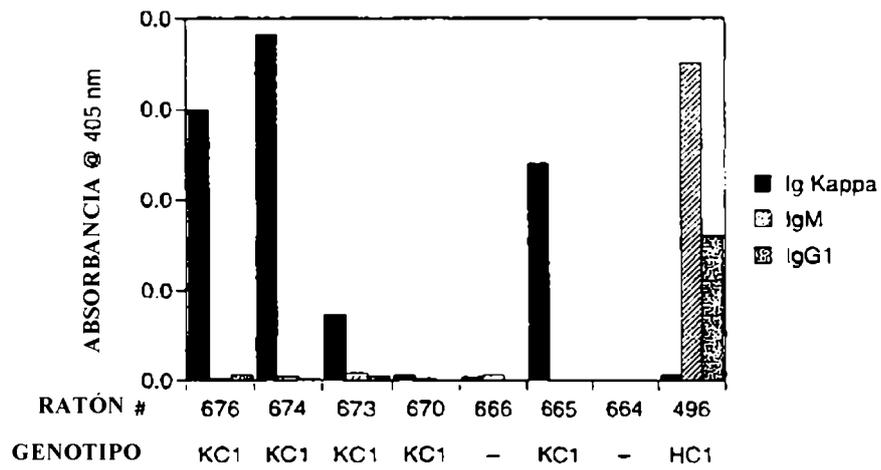


FIG. 35

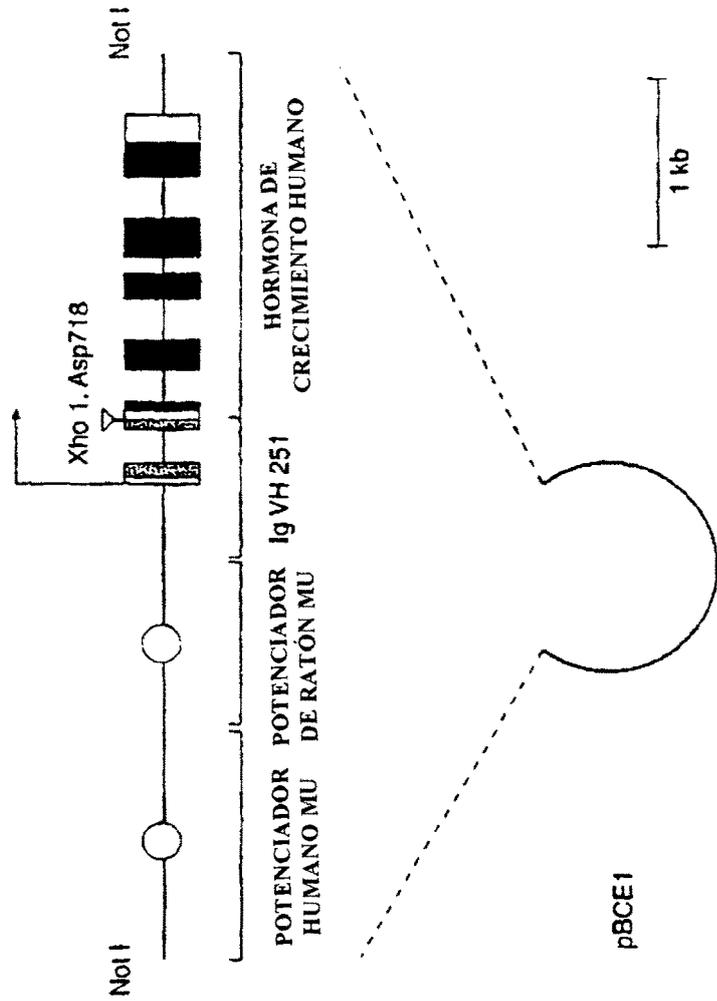


FIG. 36

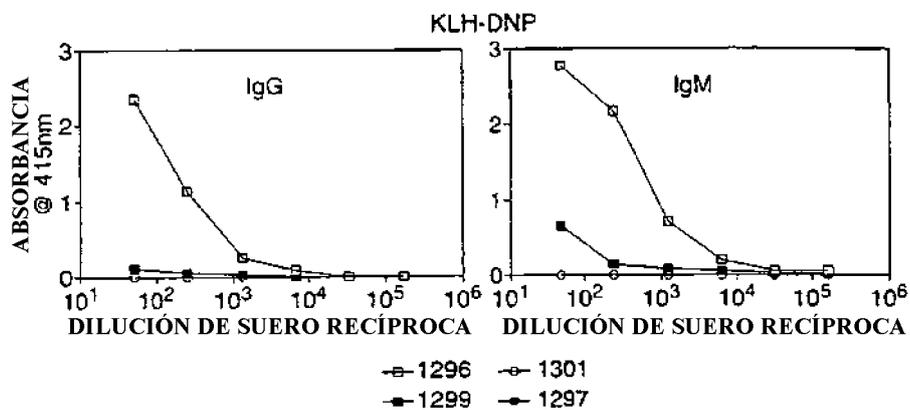


FIG. 37A

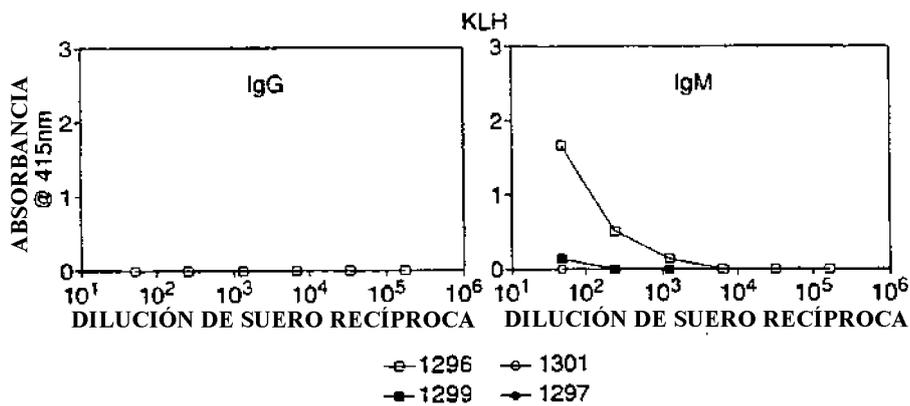


FIG. 37B

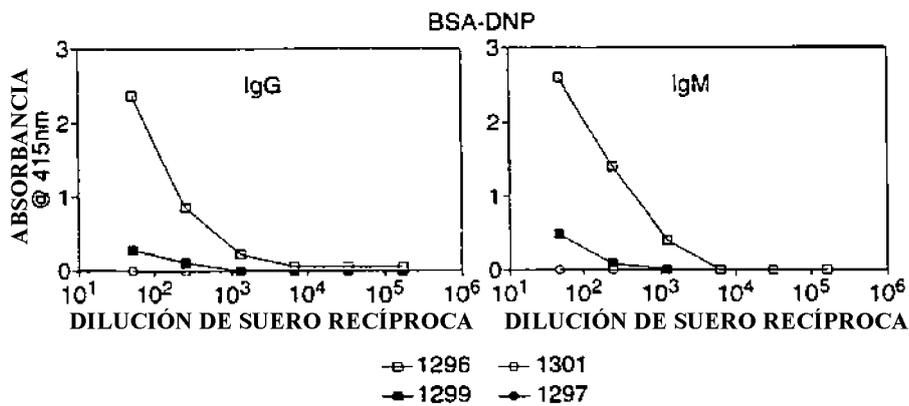


FIG. 37C

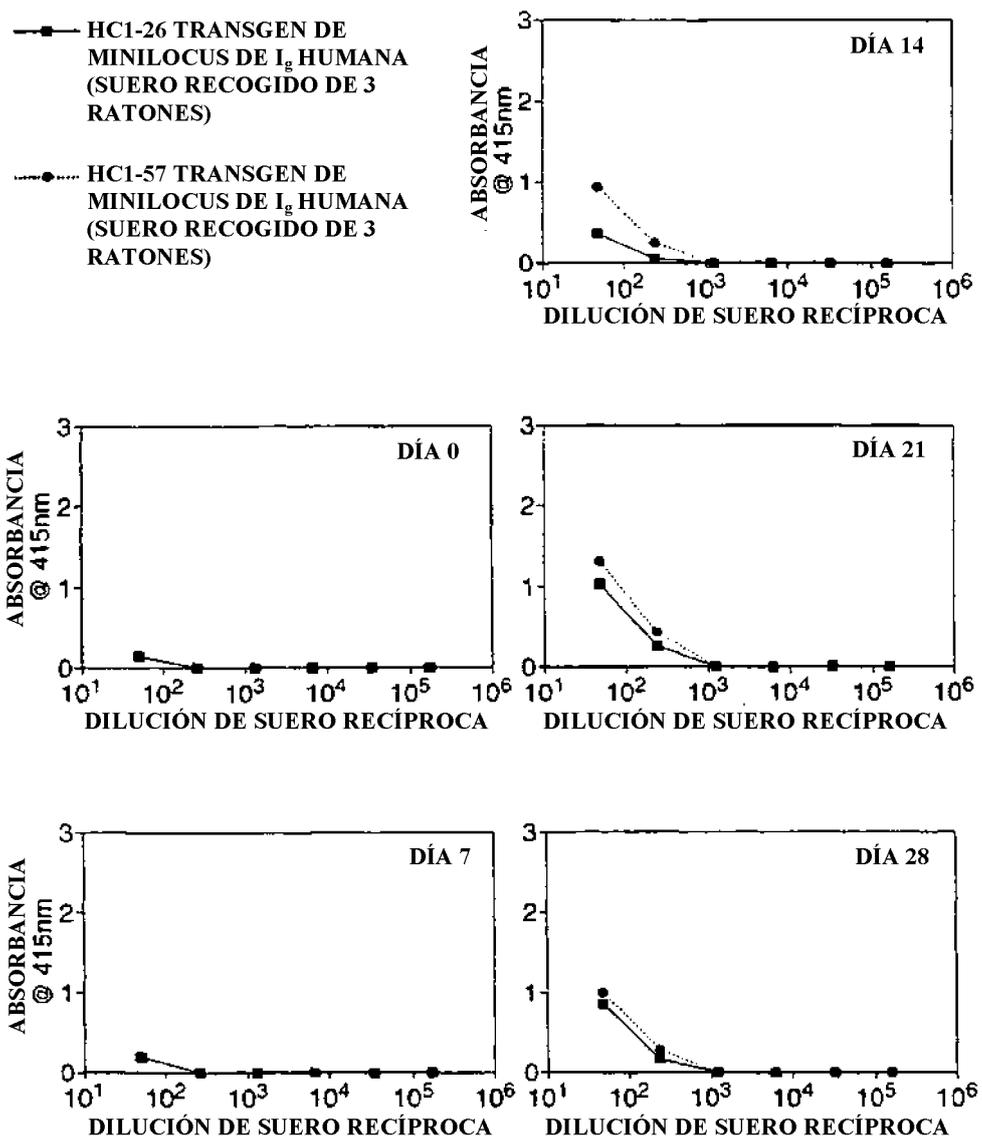


FIG. 38

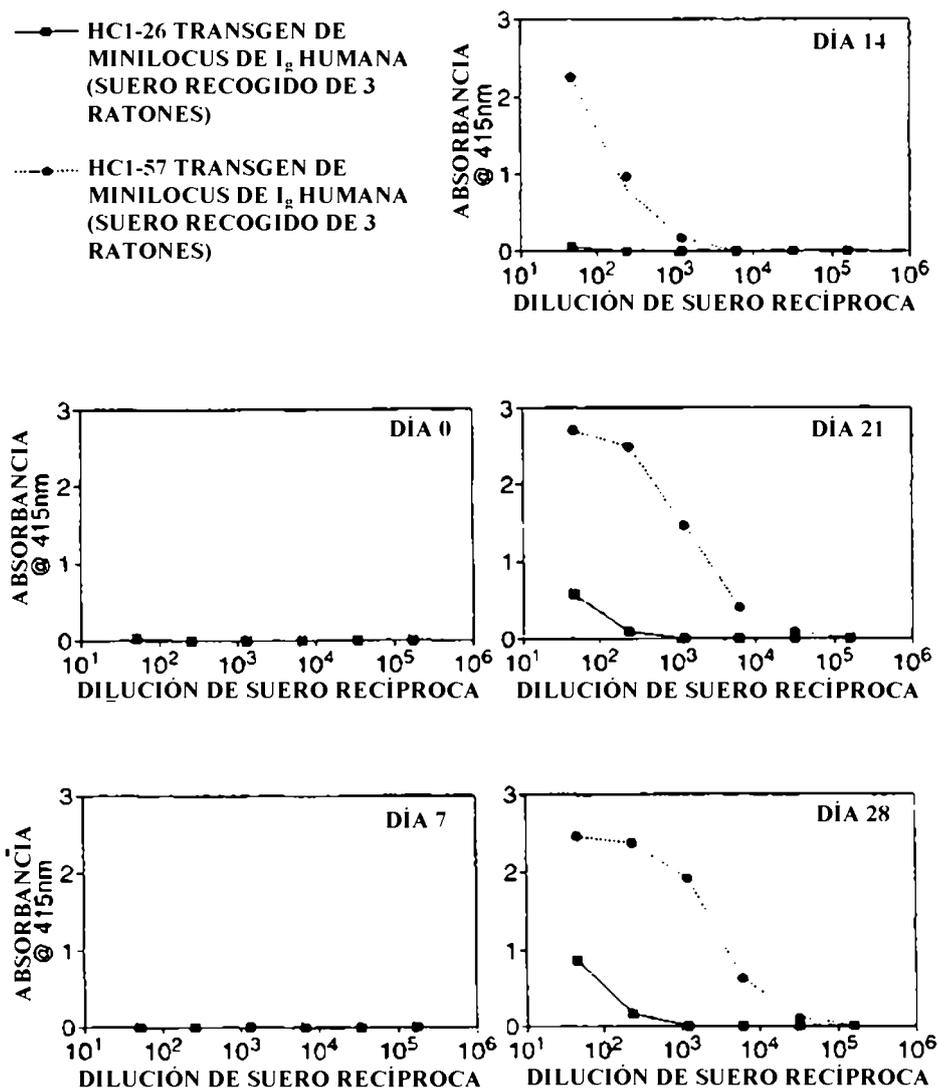


FIG. 39

ES 2 345 580 T3

TTTTCTGGCC	TGACAACCAG	GGTGGCGCAG	GATGCTCAGT	GCAGAGAGGA	50
AGAAGCAGGT	GGTCTCTGCA	GCTGGAAGCT	CAGCTCCCAC	CCAGCTGCTT	100
TGCATGTCCC	TCCCAGCTGC	CCTACCTTCC	AGAGCC <u>DATA</u>	<u>TCAAT</u> GCCTG	150
TGTCAGAGCC	CTGGGGAGGA	ACTGCTCAGT	TAGGACCCAG	AGGGAACCAT	200
GGAAGCCCCA	GCTCAGCTTC	TCTTCCTCCT	GCTACTCTGG	CTCCCAGgtg	250
tGluAlaPro	AlaGlnLeuL	euPheLeuLe	uLeuLeuTrp	LeuPro	
agggggaacc	atgaggtggt	tttgacatt	agtgaaaact	cttgccacct	300
ctgctcagca	agaaatataa	ttaaaattca	aagtatatca	acaattttgg	350
ctctactcaa	agacagttgg	tttgatcttg	attacatgag	tgcattttctg	400
ttttattttcc	aatttcagAT	ACCACCGGAG	AAATTGTGTT	GACACAGTCT	450
	Asp ThrThrGlyG	luIleValLe	uThrGlnSer		
CCAGCCACCC	TGTCTTTGTC	TCCAGGGGAA	AGAGCCACCC	TCTCCTGCAG	500
ProAlaThrL	euSerLeuSe	rProGlyGlu	ArgAlaThrL	euSerCysAr	
GGCCAGTCAG	AGTGTTAGCA	GCTACTTAGC	CTGGTACCAA	CAGAAACCTG	550
gAlaSerGln	SerValSerS	erTyrLeuAl	aTrpTyrGln	GlnLysProG	
GCCAGGCTCC	CAGGCTCCTC	ATCTATGATG	CATCCAACAG	GGCCACTGGC	600
lyGlnAlaPr	oArgLeuLeu	IleTyrAspA	laSerAsnAr	gAlaThrGly	
ATCCAGCCA	GGTTCAGTGG	CAGTGGGTCT	GGGACAGACT	TCACTCTCAC	650
IleProAlaA	rgPheSerGl	ySerGlySer	GlyThrAspP	heThrLeuTh	
CATCAGCAGC	CTAGAGCCTG	AAGATTTTGC	AGTTTATTAC	TGTCAGCAGC	700
rIleSerSer	LeuGluProG	luAspPheAl	aValTyrTyr	CysGlnGlnA	
GTAGCAACTG	GCCTCC <u>CACA</u>	<u>GTGATTCCAC</u>	<u>ATGAAACAAA</u>	<u>AACCCCAACA</u>	750
rgSerAsnTr	pPro				
AGACCATCAG	TGTTTACTAG	ATTATTATAC	CAGCTGCTTC	CTTTACAGAC	800
AGCTAGTGGG	GT				812

FIG. 41

ES 2 345 580 T3

AGGGCGGCGC AGATGCTCAG TGCAGAGAGA AGAAACAGGT GGTCTCTGCA 50
 GCTGGAAGCT CAGCTCCCAC CCCAGCTGCT TTGCATGTCC CTCCCAGCTG 100
 CCCTACCTTC CAGAGCCAT ATCAATGCCT GGGTCAGAGC TCTGGGGAGG 150
 AACTGCTCAG TTAGGACCCA GACGGAACCA TGGAAAGCCCC AGCGCAGCTT 200
 CTCTTCCTCC TGCTACTCTG GCTCACAGgt gaggggaata tgaggtgtct 250
 LeuPheLeuL euLeuLeuTr pLeuThr
 ttgcacatca gtgaaaactc ctgccacctc tgctcagcaa gaaatataat 300
 taaaattcaa aatagatcaa caattttggc tctactcaaa gacagtgggt 350
 ttgattttga ttacatgagt gcattttctgt tttattttcca atttcagATA 400
 AspT
 CCACCGGAGA AATTGTGTTG ACACAGTCTC CAGCCACCCT GTCTTTGTCT 450
 hrThrGlyGl uIleValLeu ThrGlnSerP roAlaThrLe uSerLeuSer
 CCAGGGGAAA GAGCCACCCT CTCCTGCAGG GCCAGTCAGG GTGTTAGCAG 500
 ProGlyGluA rgAlaThrLe uSerCysArg AlaSerGlnG lyValSerSe
 CTACTTAGCC TGGTACCAGC AGAAACCTGG CCAGGCTCCC AGGCTCCTCA 550
 rTyrLeuAla TrpTyrGlnG lnLysProGl yGlnAlaPro ArgLeuLeuI
 TCTATGATGC ATCCAACAGG GCCACTGGCA TCCCAGCCAG GTTCAGTGGC 600
 leTyrAspAl aSerAsnArg AlaThrGlyI leProAlaAr gPheSerGly
 AGTGGGCTG GGACAGACTT CACTCTCACC ATCAGCAGCC TAGAGCCTGA 650
 SerGlyProG lyThrAspPh eThrLeuThr IleSerSerL euGluProGl
 AGATTTTGCA GTTTATTACT GTCAGCAGCG TAGCAACTGG CATCCACAG 700
TGATTCCACA TGAACAACAAA ACCCCAACAA GACCATCAGT GTTTACTAGA 750
 TTATTATACC AGCTGCTTCC TTTACAGACA GCTAGTGGGG TGGCCACTCA 800
 GTGTTAGCAT CTCAGCTCTA TTTGGCCATT TTGGAGTTCA AGTTGTCAAG 850
 TCCAAAATTA CTTATGTTAG TCCATTGCAT CATACCATTT CAGTGTGGCT 900

FIG. 42

ES 2 345 580 T3

CCGCCCCAGC TGCTTTGCAT GTCCTCCCA GCCGCCCTGC AGTCCAGAGC 50
COATATCAAT GCCTGGGTCA GAGCTCTGGA GAAGAGCTGC TCAGTTAGGA 100
 ACCCCAGAGG GAACCATGGA AACCCCAGCG CAGCTTCTCT TCCTCCTGCT 150
 MetGl uThrProAla GlnLeuLeuP heLeuLeuLe
 ACTCTGGCTC CCAGgtgagg ggaacatggg atggttttgc atgtcagtga 200
 uLeuTrpLeu Pro
 aaaccctctc aagtcctggt acctggcaac tctgctcagt caatacaata 250
 attaaagctc aatataaagc aataattctg gctcttctgg gaagacaatg 300
 ggtttgattt agattacatg ggtgactttt ctgttttatt tccaatctca 350
 gATACCACCG GAGAAATTGT GTTGACGCAG TCTCCAGGCA CCCTGTCTTT 400
 AspThrThrG lyGluIleVa lLeuThrGln SerProGlyT hrLeuSerLe
 GTCTCCAGGG GAAAGAGCCA CCCTCTCCTG CAGGGCCAGT CAGAGTGTTA 450
 uSerProGly GluArgAlaT hrLeuSerCy sArgAlaSer GlnSerValS
 GCAGCAGCTA CTTAGCCTGG TACCAGCAGA AACCTGGCCA GGCTCCCAGG 500
 erSerSerTy rLeuAlaTrp TyrGlnGlnL ysProGlyGl nAlaProArg
 CTCCTCATCT ATGGTGCATC CAGCAGGGCC ACTGGCATCC CAGACAGGTT 550
 LeuLeuIleT yrGlyAlaSe rSerArgAla ThrGlyIleP roAspArgPh
 CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CAGACTTCAC TCTCACCATC AGCAGACTGG 600
 eSerGlySer GlySerGlyT hrAspPheTh rLeuThrIle SerArgLeuG
 AGCCTGAAGA TTTTGCAGTG TATTACTGTC AGCAGTATGG TAGCTCACCT 650
 luProGluAs pPheAlaVal TyrTyrCysG lnGlnTyrGl ySerSerPro
CCACAGTGA TTCAGCTTGA AACAAAAACG TCTGCAAGAC CTTCATTGTT 700
 TACTAGATTA TACCAGCTGC TTCCTTTACA GATAGCTGCT GCAATGACAA 750
 CTCAATTTAG CATCTCTCTC TGCTTGGGCA TTTTGGGGAT CTAAAAAAG 800
 TAATCCCTTG ATATATTTTT GACTCTGATT CCTGCATTTT TCCTCAGACC 850
 AAGATGGACA GCCAGGTTTA AGCACAGTTT CACAGTAATG GCCACTGGAT 900

FIG. 43

ES 2 345 580 T3

AAACACATTC TCTGCAGACA AATTTGAGCT ACCTTGATCT TACCTGGACA 50
 GGTGGGGACA CTGAGCTGGT GCTGAGTTAC TCAGATGCCG CAGCTCTGCA 100
 GCTGTGCCCA GCCTGCCCCA TCCCCTGCTC ATTTGCATGT TCCCAGAGCA 150
 CAACCTCCTG CCCTGAAGCC TTATTAATAG GCTGGTCAGA CTTTGTGCAG 200
 GAATCAGACC CAGTCAGGAC ACAGCATGGA CATGAGGGTC CTCGCTCAGC 250
 TCCTGGGGCT CCTGCTGCTC TGTTTCCCAG gtaaggatgg agaacactag 300
 euLeuGlyLe uLeuLeuLeu CysPhePro
 cagtttactc agcccagggt gctcagtact gctttactat tcagggaaat 350
 tctcttaciaa catgattaat tgtgtggaca tttgttttta tgtttccaat 400
 ctcagGTGCC AGATGTGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCACTGT 450
 GlyAla ArgCysAspI leGlnMetTh rGlnSerPro SerSerLeuS
 CTGCATCTGT AGGAGACAGA GTCACCATCA CTTGTCCGGC GAGTCAGGGT 500
 erAlaSerVa lGlyAspArg ValThrIleT hrCysArgAl aSerGlnGly
 ATTAGCAGCT GGTTAGCCTG GTATCAGCAG AAACCAGAGA AAGCCCCTAA 550
 IleSerSerT rpLeuAlaTr pTyrGlnGln LysProGluL ysAlaProLy
 GTCCCTGATC TATGCTGCAT CCAGTTTGCA AAGTGGGGTC CCATCAAGGT 600
 sSerLeuIle TyrAlaAlaS erSerLeuGl nSerGlyVal ProSerArgP
 TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTC A CTCTCACCAT CAGCAGCCTG 650
 heSerGlySe rGlySerGly ThrAspPheT hrLeuThrIl eSerSerLeu
 CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGC CAACAGTATA ATAGTTACCC 700
 GlnProGluA spPheAlaTh rTyrTyrCys GlnGlnTyrA snSerTyrPr
 ACCCACAGTG TTACACACCC AAACATAAAC CCCCAGGGAA GCAGATGTGT 750
 o
 GAGGCTGGGC TGCCCCAGCT GCTTCTCCTG ATGCCTCCAT CAGCTGAGAG 800
 TGTTCTCAG ATGCAGCCAC ACTCTGATGG TGTTGGTAGA TGGGGAC 847

FIG. 44

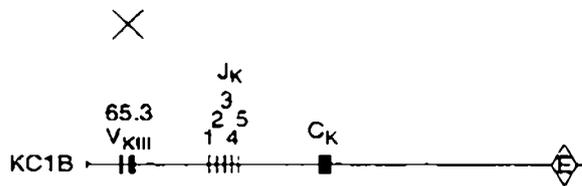
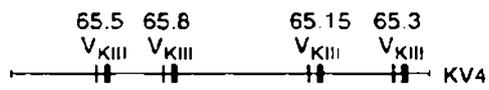


FIG. 45

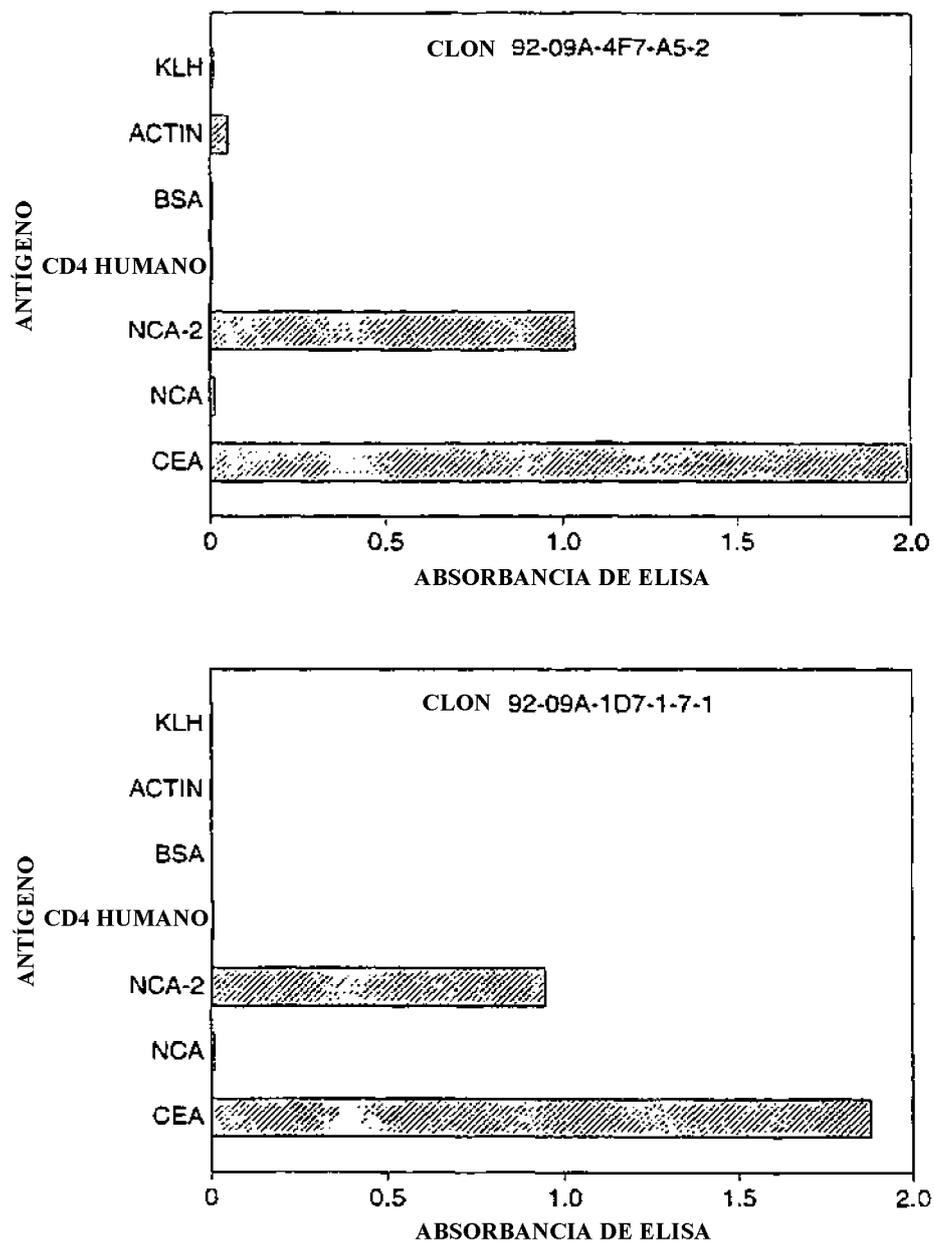


FIG. 46

	HUMANO		RATÓN	
	n	0 n	3	4 y
5 DXP1 J6 G1	6CTTCGACACCCGCCATGTATTACTGTGGAGA	catttatggttcggggagttagc	CGGTGTGGACGCTCGGGGCAAGGGACACGGTACAGCTCTCCAG	CCAAATGACACCCCCCATCTGGTCTATCCACT
7 DHP2 J3 G1	6CTTCGACACCCGCCATGTATTACTGTCCGAGA	cacttggccattggat	GCCTTTGATgCTGGGGCCAGGGCAATGCTACGCTCTCCAG	CCAAATGACACCCCAATGCTCTCCACT
2 DHP2 J3 G2b	6CTTCGACACCCGCCATGTATTACTGTCCGAGA	ACTGGGGatgat	GCYTTGATATCTGGGGCCAGGGCAATGCTACGCTCTCCAG	CCAAATGACACCCCAATGCTCTCCACT
3 D? J3 G2b	6CTTCGACACCCGCCATGTATTACTGTCCGAGA	cggggggatgat	GCCTTTGATATCTGGGGCCAGGGCAATGCTACGCTCTCCAG	CCAAATGACACCCCAATGCTCTCCACT
4 DXP1 J4 G2b	6CTTCGACACCCGCCATGTATTACTGTCCGAGA	cattggggac-atatTTCCGGGAGTATTttcc	TGACTACTGGGGCCAGGGCAATGCTGGTACGCTCTCCAG	CCAAATGACACCCCAATGCTCTCCACT
10 DHP2 J3 G2b	6CTTCGACACCCGCCATGTATTACTGTCCGAGA	ACTTGGGGatgat	GCCTTTGATATCTGGGGCCAGGGCAATGCTACGCTCTCCAG	CCAAATGACACCCCAATGCTCTCCACT
1 D? J3 G3	6CTTCGACACCCGCCATGTATTACTGTCCGAGA	cotgggtctatg	GATATCTGGGGCCAGGGCAATGCTACGCTCTCCAG	CTACACACACAGCCCCCATCTGGTCTATCCCTT
6 DHP2 J4 G3	6CTTCGACACCCGCCATGTATTACTGTCCGAGA	ggggggcgtcactTGGGGatcg	TTTGACTATCTGGGGCCAGGGCAATGCTGGTACGCTCTCCAG	CTACACACACAGCCCCCATCTGGTCTATCCCTT
8 DIR2 J3 G3	6CTTCGACACCCGCCATGTATTACTGTCCGAGA	agggatctctcagat	GCCTTTGATATCTGGGGCCAGGGCAATGCTACGCTCTCCAG	CTACACACACAGCCCCCATCTGGTCTATCCCTT
9 DIR2 J6 G3	6CTTCGACACCCGCCATGTATTACTGTCCGAGA	cggggggcct	TACTACTACTACGGTATGGACGCTGGGGCCAGGGCAATGCTGGTACGCTCTCCAG	CTACACACACAGCCCCCATCTGGTCTATCCCTT

FIG. 47

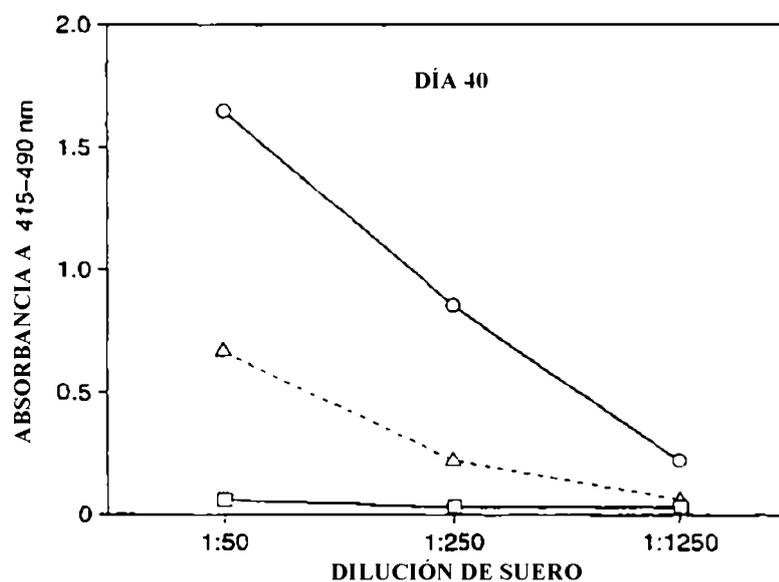
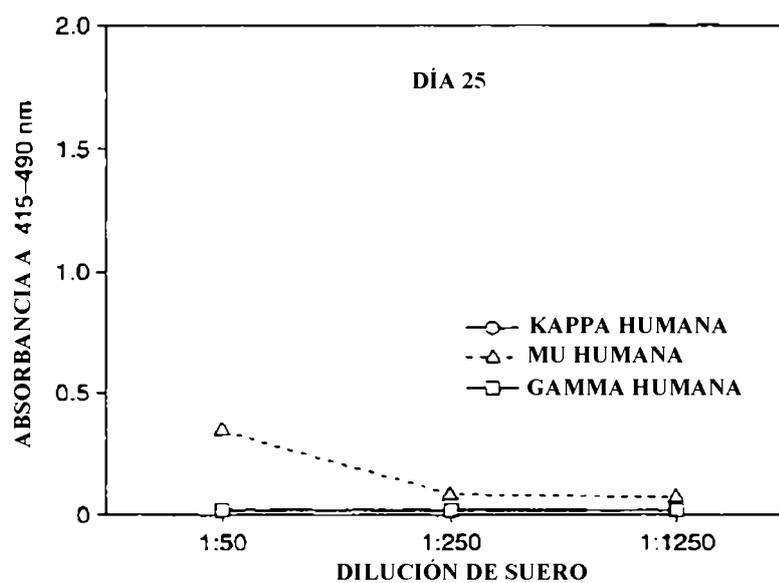


FIG. 48

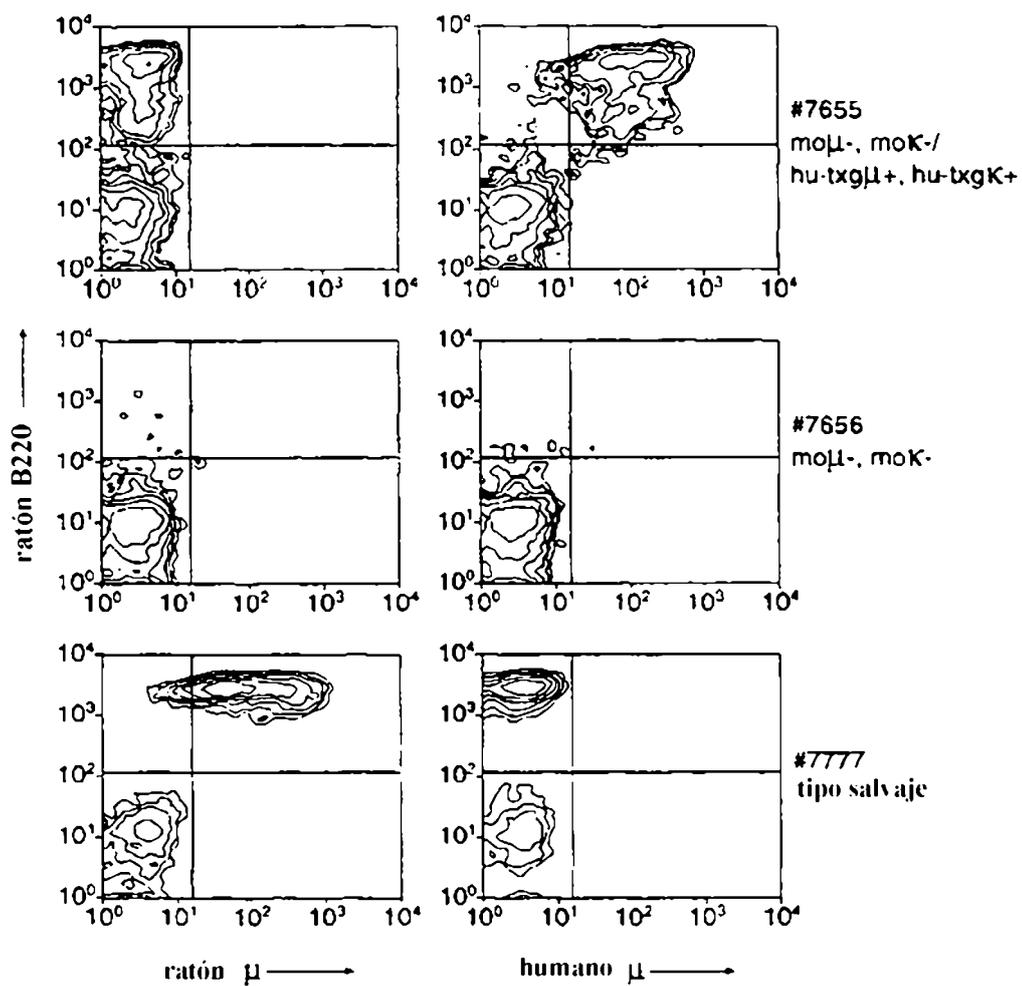


FIG. 49

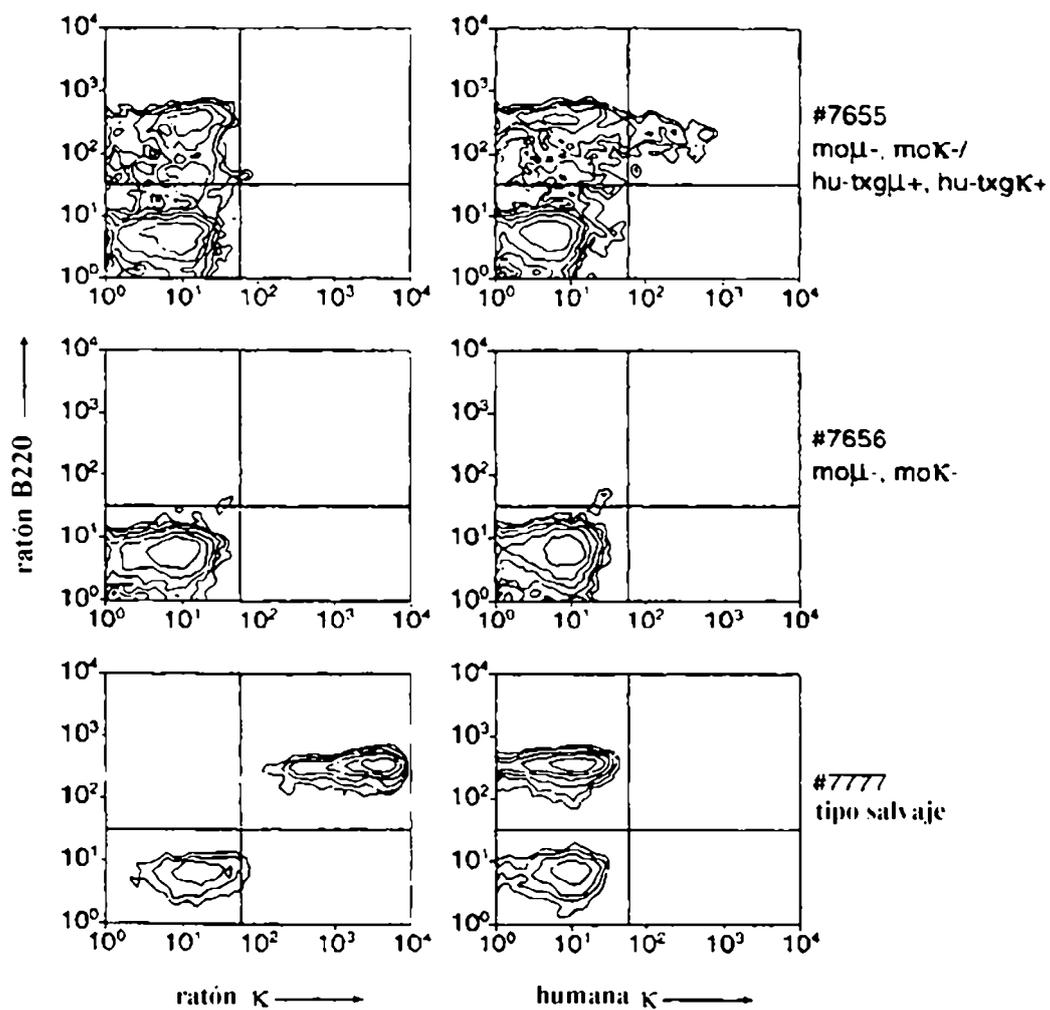


FIG. 50

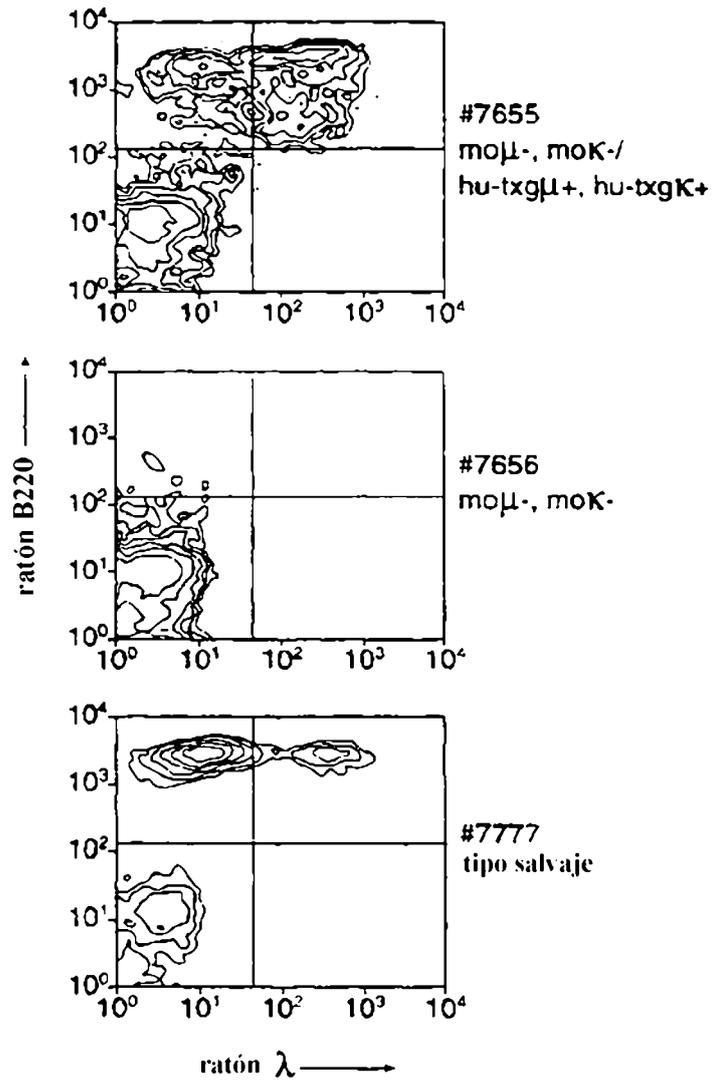


FIG. 51

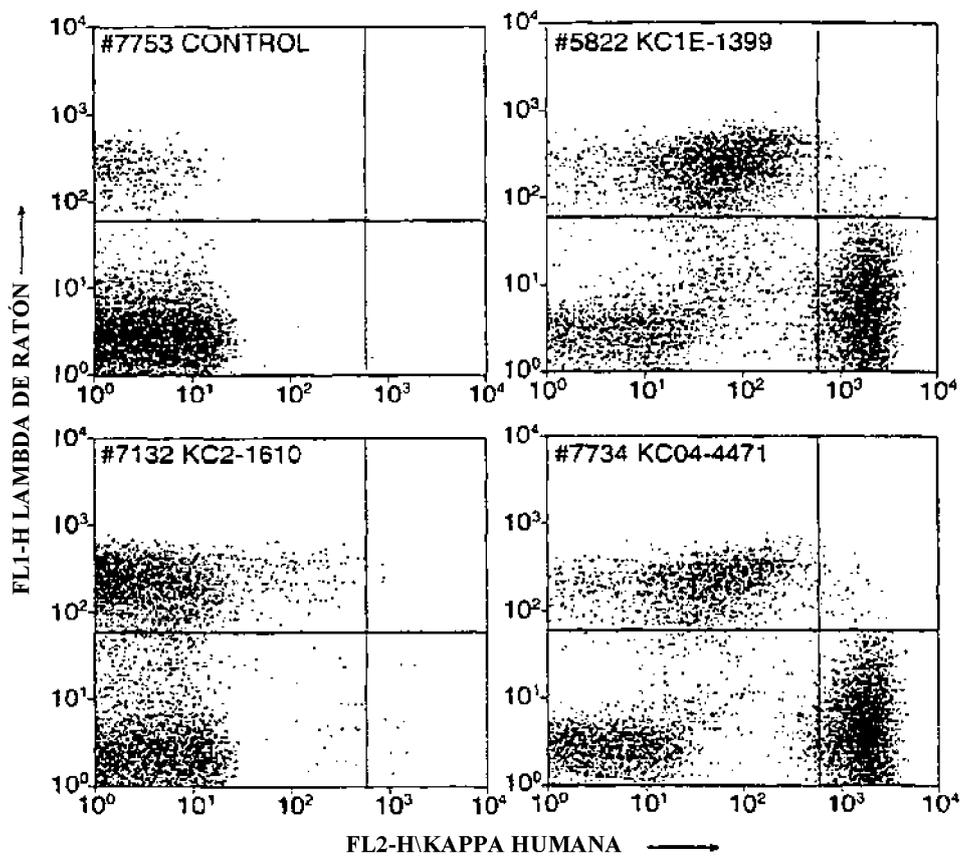


FIG. 52

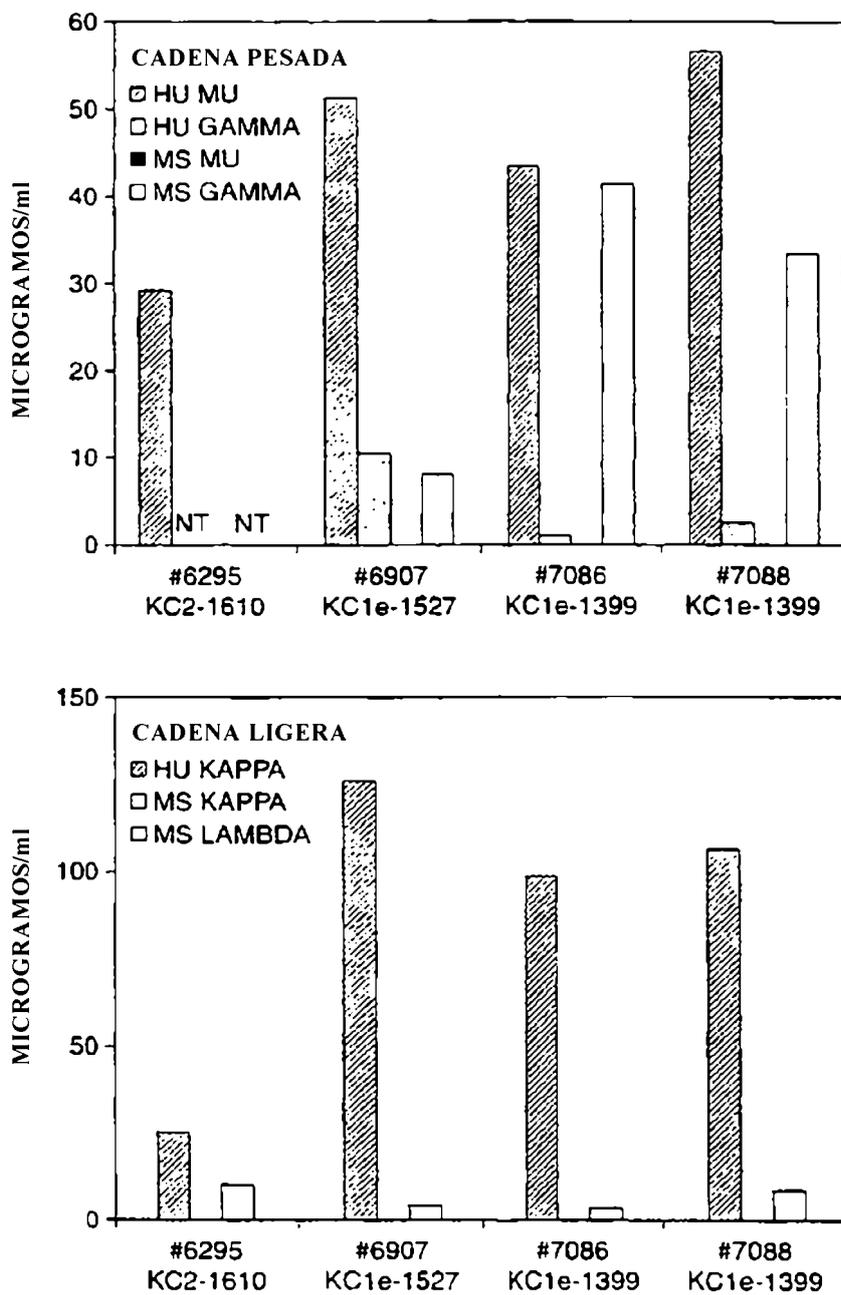


FIG. 53

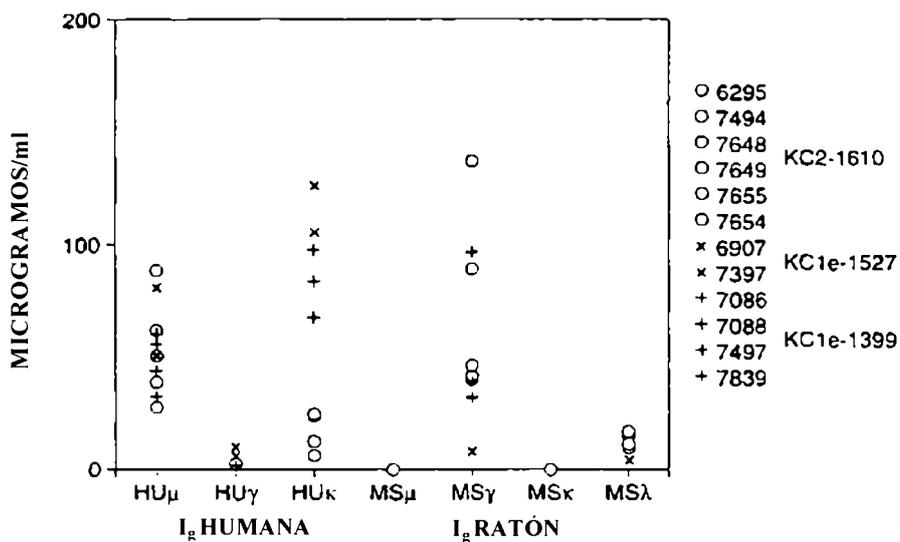


FIG. 54



FIG. 55

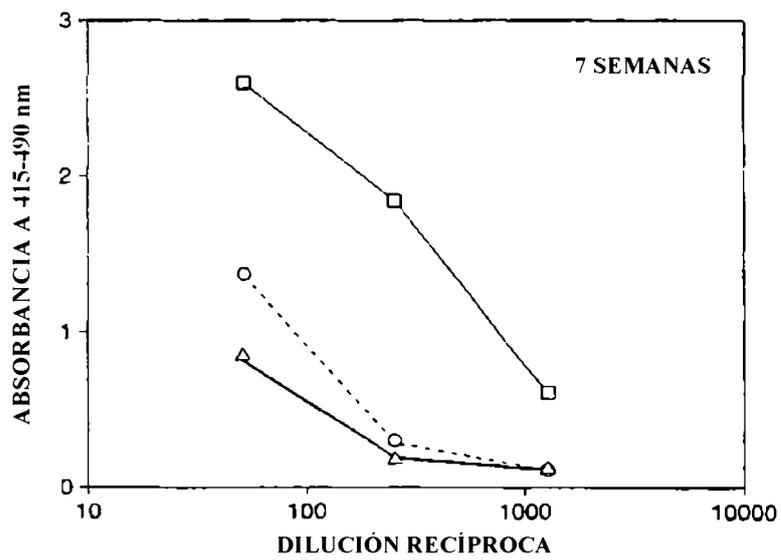
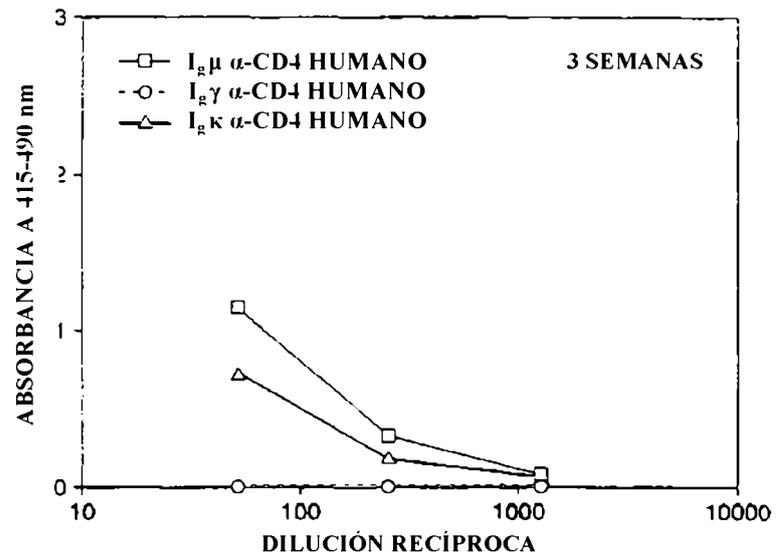
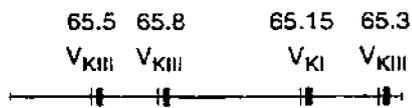
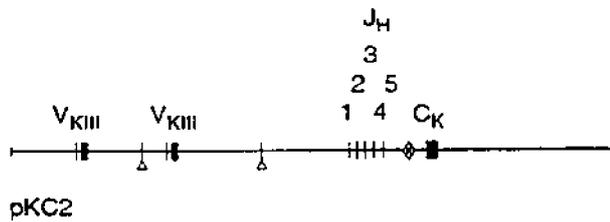
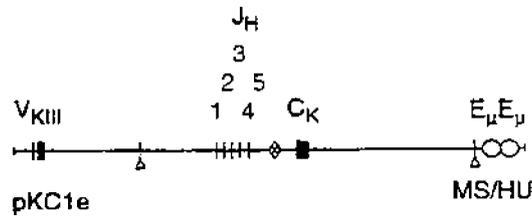
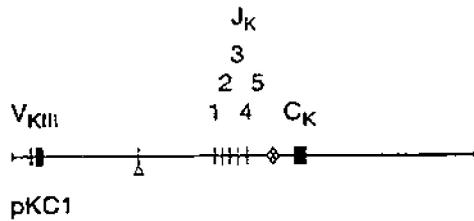


FIG. 56

0 5 10 15 20 25 30 35 40 45Kb

MINILOCI DE CADENA LIGERA



×

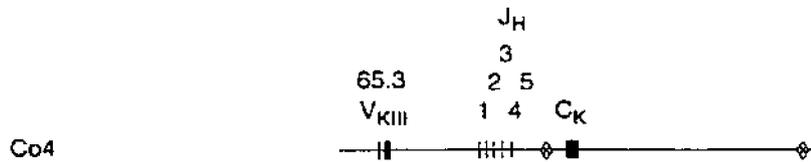


FIG. 57A

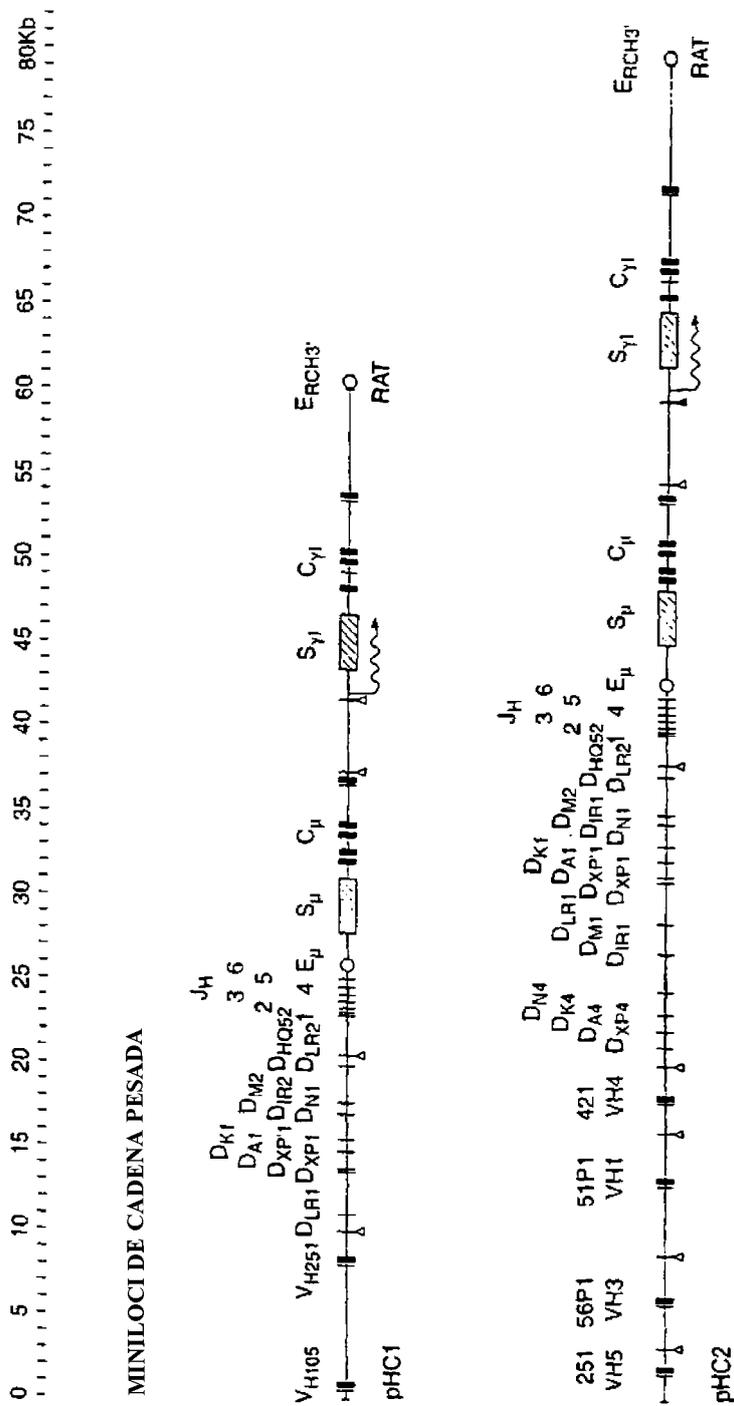


FIG. 57B

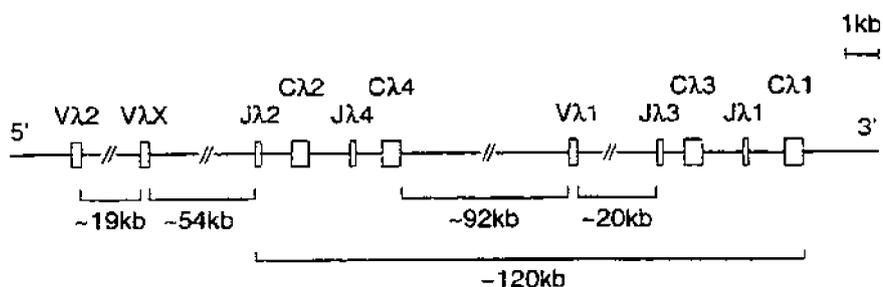
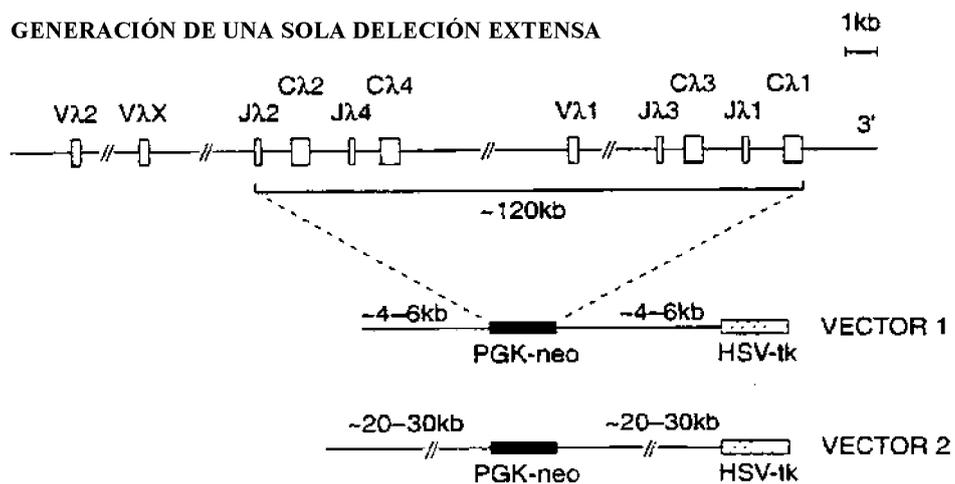


FIG. 58

GENERACIÓN DE UNA SOLA DELECIÓN EXTENSA



GENERACIÓN DE DOS DELECIONES PEQUEÑAS

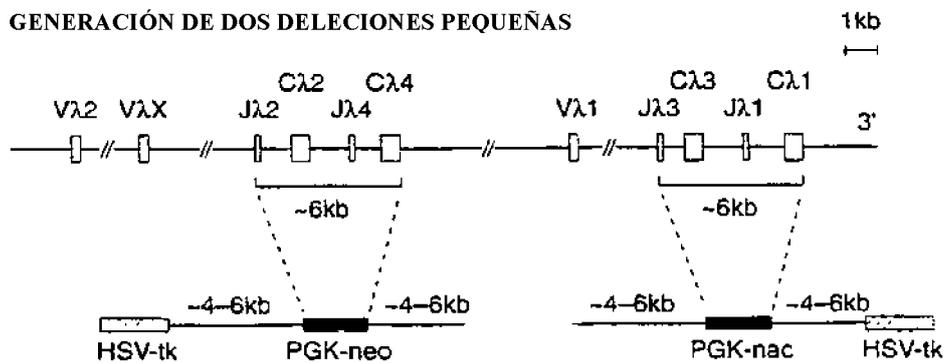


FIG. 59

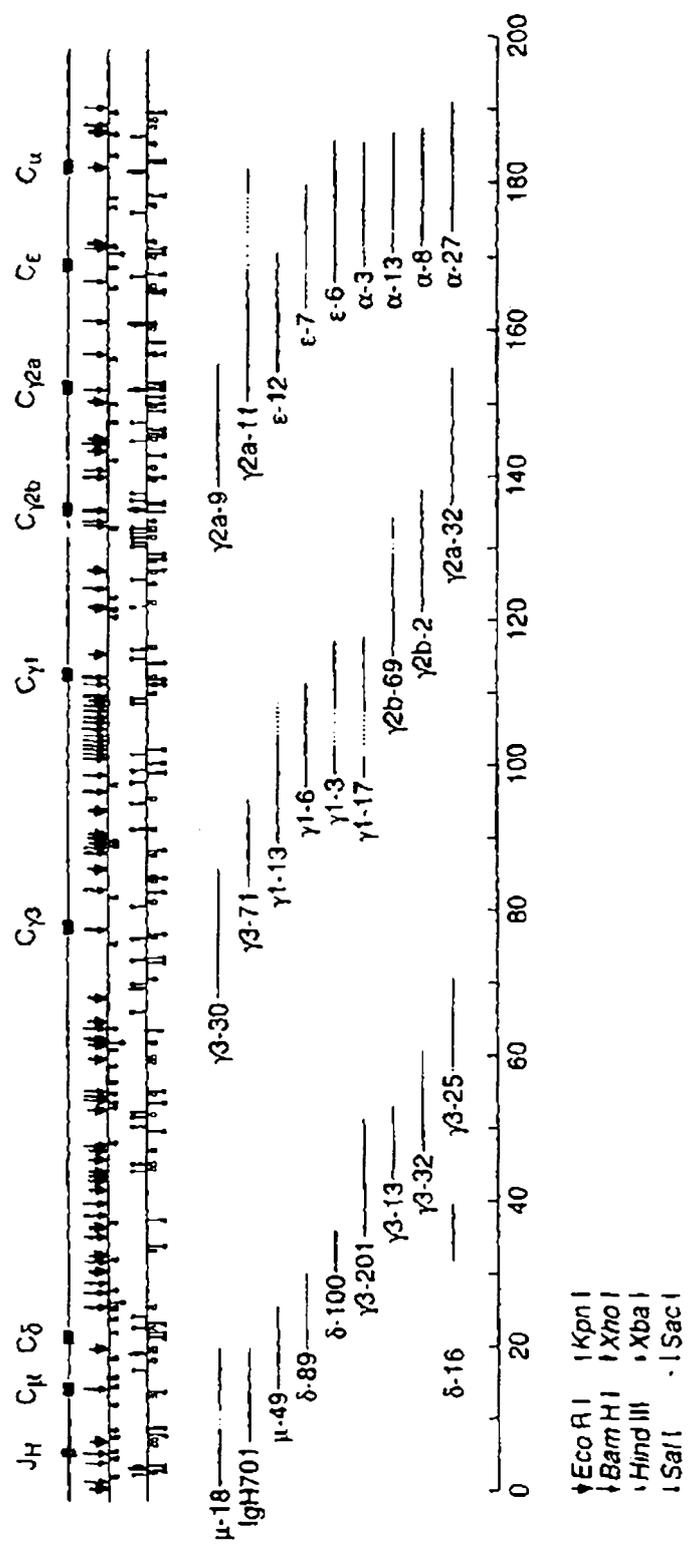


FIG. 60

CGAGAGGGGCGGGGGAAGACTACTATCCCAGGCAGGTTTTAGGTTCCAGAGTCTGCGAG
AAATCCCACCATCTACCCACTGACACTCCCACCAGTCCTGTGCAGTGATCCCCTGATAAT
CGGCTGCCTGATTCACGATTACTTCCCTTTCCGCACGATGAATGTGACCTGGGGAAAGAG
TGGGAAGGATATAACCACCGTGAACFTTCCACCTGCCCTCGCCTCTGGGGGACGGTACAC
CATGAGCAGCCAGTTAACCTGCCAGCTGTGAGTGCCCAGAAGGAGAGTCCGTGAAATG
TTCCGTGCAACATGACTCTAACCCCGTCCAAGAATTGGATGTGAATTGCTCTGGTAAAGA
ACGTTAGGGGGTCAGCTAGGGGTGGGATAAGTCTACCTTATCTAGATCCATATATCCCT
CTGATGCACACCCTCACAGGAATCCCTCAGAAACCTCCACTATGGGGATTGGGGGAAGGA
AGCGTAAACAGGTCTAGAAGGAGCTGGAGGCCTCAGAACATCCAGAAACGGGGACAGCAA
AGGAGACAAGGAGAATATACTGATTTGCTAGGACATCTTCTGTTACAGGTCTACTCCTC
CTCCTCTATTACTATTCTTCTGCCAGCCAGCCTGTCACTGCAGCGCCAGCTCTTG
AGGACCTGCTCCTGGGTTT CAGATGCCAGCATCACATGTA CTCTGAATGGCCTGAGAAATC
CTGAGGGAGCTGCTTTCACCTGGGAGCCCTCCACTGGGAAGGATGCAGTGCAGAAGAAAG
CTGCGCAGAATTCCTGCGGCTGCTACAGTGTGTCCAGCGTCTGCTGGCTGTGCTGAGC
GCTGGAACAGTGGCGCATCAATCAAGTGCACAGTTACCCATCCTGAGTCTGGCACCTTAA
CTGGCACAATTGCCAAAGTCACAGGTGAGCTCAGATGCATACCAGGACATTGTATGACGT
TCCCTGCTCACATGCCTGCTTTCCTCTATAATACAGATGCTCAACTAACTGCTCATGTC
CTTATATCACAGAGGGAAATTGGAGCTATCTGAGGAACTGCCCAGAAGGGAAAGGGCAGAG
GGGCTTGCTCTCCTTGCTGAGCCATAACTCTTCTTTCTACCTTCCAGTGAACACCTTC
CCACCCCAGGTCCACCTGCTACCGCCGCCGTCCGAGGAGCTGGCCCTGAATGAGCTCTTG
TCCCTGACATGCCTGGTCCGAGCTTTC AACCCCTAAAGAAGTGCTGGTGCGATGGCTGCAT
GGAAATGAGGAGCTGTCCCAGAAAGCTACCTAGTGTTTGAGCCCCTAAAGGAGCCAGGC
GAGGGAGCCACCACCTACCTGGTGACAAGCGTGTTGCGTGTATCAGCTGAAACCTGGAAA
CAGGGTGACCAGTACTCCTGCATGGTGGGCCACGAGGCCTTGCCCATGAACTTCACCCAG
AAGACCATCGACCGTCTGTGGGTAAACCCACCAATGTCAGCGTGTCTGTGATCATGTCA
GAGGGAGATGGCATCTGCTACTGAGCCACCCTGCCTGTCCCTACTCCTAGAATAAACTCT
GTGCTCATCCAAAGTATCCCTGCACTTCCACCCAGTGCCTGTCCACCACCCTGGGGTCTA
CGAAACACAGGGAGGGGT CAGGGCCCAGGGAGGGAGAAATACCACCACCTAAGC

FIG. 61

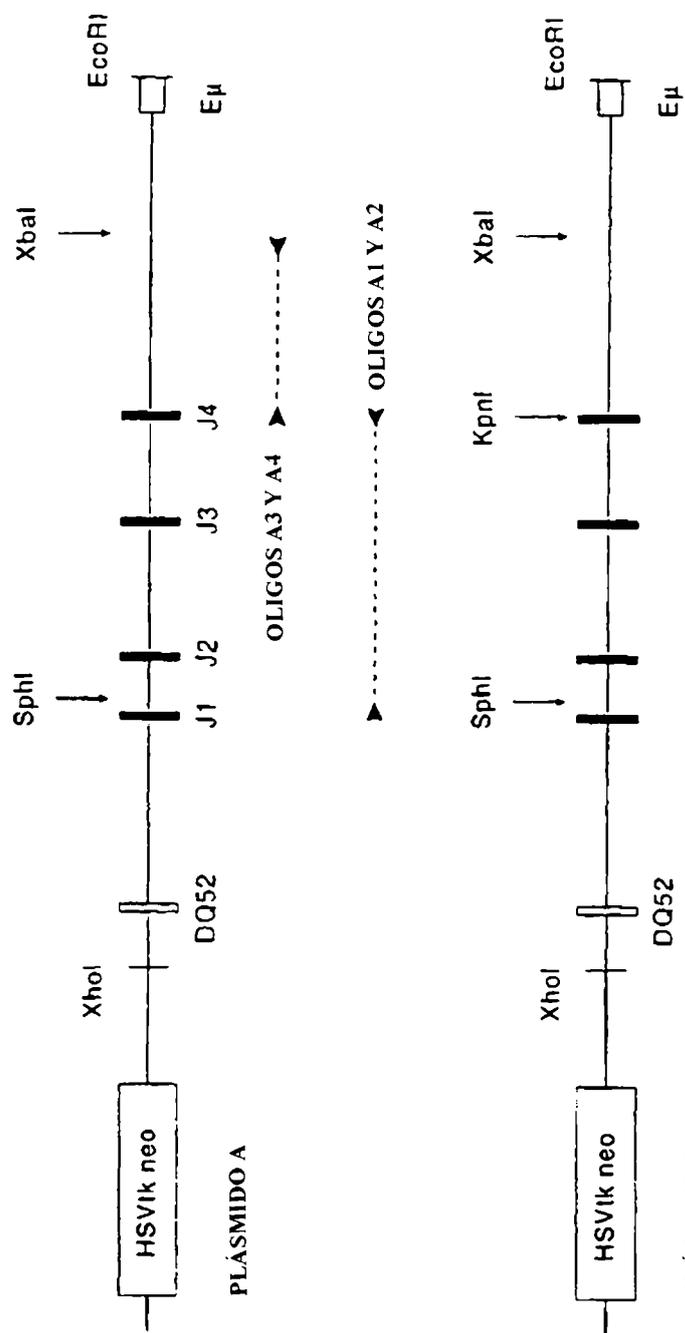


FIG. 62

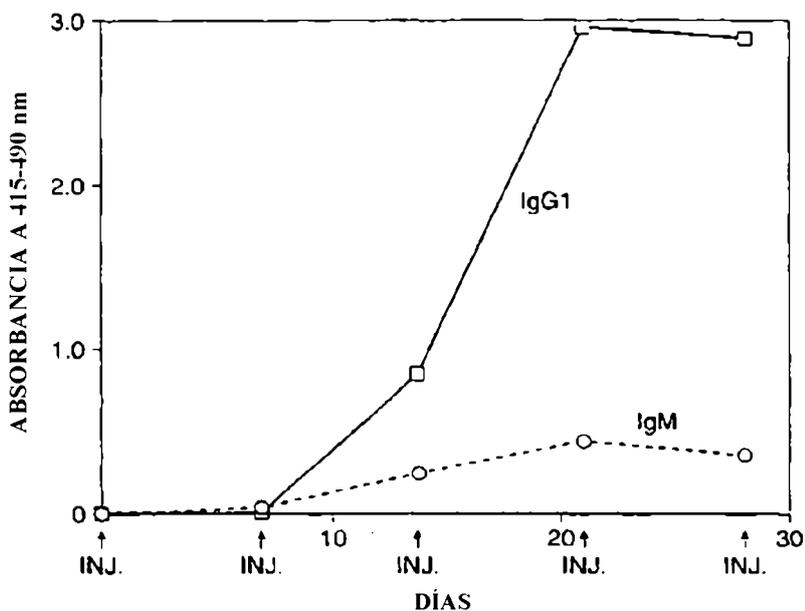


FIG. 63

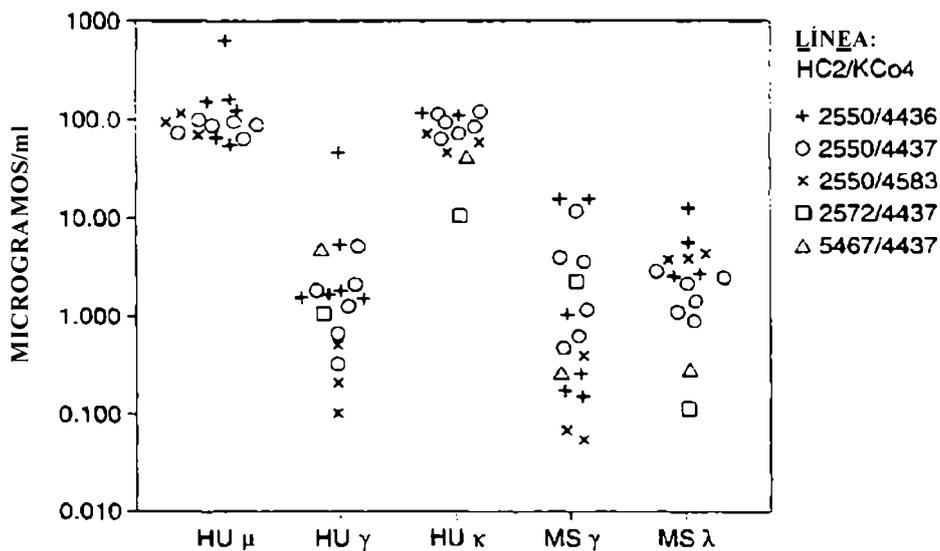


FIG. 70

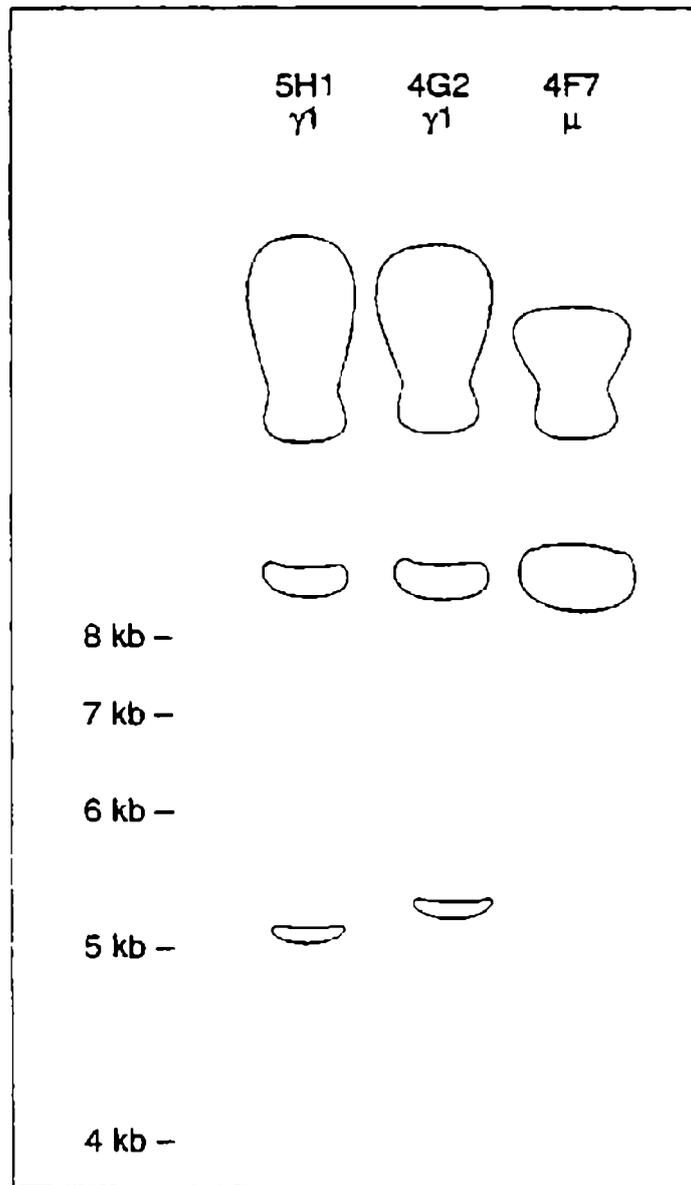


FIG. 64A

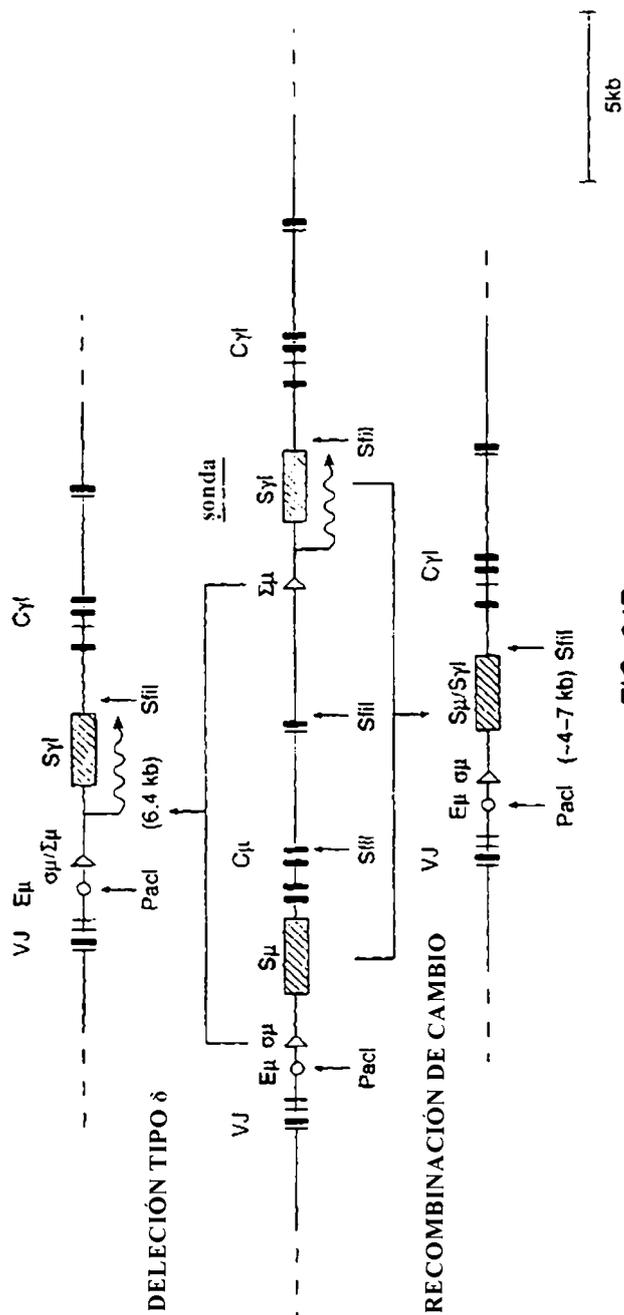


FIG. 64B

V _H 2S1	N D N	J	Cy	ratón γ1
2357.t5 DXP'1 J6	gacctggacaccgcatgtattactgtgtagga CATTtatgggttcggggagttatCG	cggtctgtagcgtctggggccaaagggaaccagggtcaacggtcaacgctctctctcag ccaaaaacgaaccccccatctgctctatccac		
2357.t7 DHQ52 J3	gacctggacaccgcatgtattactgtgtagga CactgggCATTGGAT	gctcttgatctctggggccaaagggaacaatgctcaaccgctctctcag ccaaaaacgaaccccccatctgctctatccac		mouse γ2b
2357.t2 DHQ52 J3	gacctggacaccgcatgtattactgtgtagga actcggggatGAT	gctcttgatctctggggccaaagggaacaatggtcaaccgctctctcag ccaaaaacgaaccccccatcagctctatccac		
2357.t3 D7 J3	gacctggacaccgcatgtattactgtgtagga CAGGGGAGAGAT	gctcttgatctctggggccaaagggaacaatgggtcaaccgctctctcag ccaaaaacgaaccccccatcagctctatccac		
2357.t4 DXP'1 J4	gacctggacaccgcatgtattactgtgtagga CATAAGGactatATTcggggagttattTTCC	tgacctactggggccaaagggaaccclgggtcaaccgctctctcag ccaaaaacgaaccccccatcagctctatccac		
2357.t10 DHQ52 J3	gacctggacaccgcatgtattactgtgtagga actcggggatGAT	gctcttgatctctggggccaaagggaacaatgggtcaaccgctctctcag ccaaaaacgaaccccccatcagctctatccac		mouse γ3
2357.t1 D7 J3	gacctggacaccgcatgtattactgtgtagga CATGGGTTCTATG	gatctctggggccaaagggaacaatgggtcaaccgctctctcag ctataaacgaaccccccatctgctctatccct		
2357.t6 DHQ52 J4	gacctggacaccgcatgtattactgtgtagga GAGAGAGGTCactcggggatCG	tttgactatctggggccaaagggaaccclgggtcaaccgctctctcag ctataaacgaaccccccatctgctctatccct		
2357.t8 DIR2 J3	gacctggacaccgcatgtattactgtgtagga AGagacccccCTGAT	gctcttgatctctggggccaaagggaacaatgggtcaaccgctctctcag ctataaacgaaccccccatctgctctatccct		
2357.t9 DIR2R J6	gacctggacaccgcatgtattactgtgtagga Cgggggctt	tactactactcaggtatggagctctggggccaaagggaaccagggtcaaccgctctctcag ctataaacgaaccccccatctgctctatccct		humano

FIG. 65


```

20      30      40      50      52 o 53      60
VR251.G1  TCCTGAGATCTCTGTAAGGGTCTCGATACAGCTTACAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCGGGAAGGCCCTGGAGTGGATGGGGATCTATCTCTGGTGAATCGATACCGATACAGCCCGTCTTCGAGGCGAGGTC
J2
3204.sp2b .....GT.....
J3
3204.ln10 .....G.....
J4
3204.ln3 .....G.....A.....
3204.ln7 .....A.C.G.....A.....
3204.ln8 .....G.....A.....
3204.ln14 .....G.....A.....C.....
3204.sp22 .....T.....G.....
3204.sp26 .....G.....A.....G.....
3204.sp27 .....T.....A.....
3204.sp30 .....G.....A.....(A.....
J5
3204.sp19 .....T.....A.....G.....(A.....
J6
3204.sp20 .....T.T.G.A.G.....C.G.T.....
COR I -----COR II

```

FIG. 66B.1

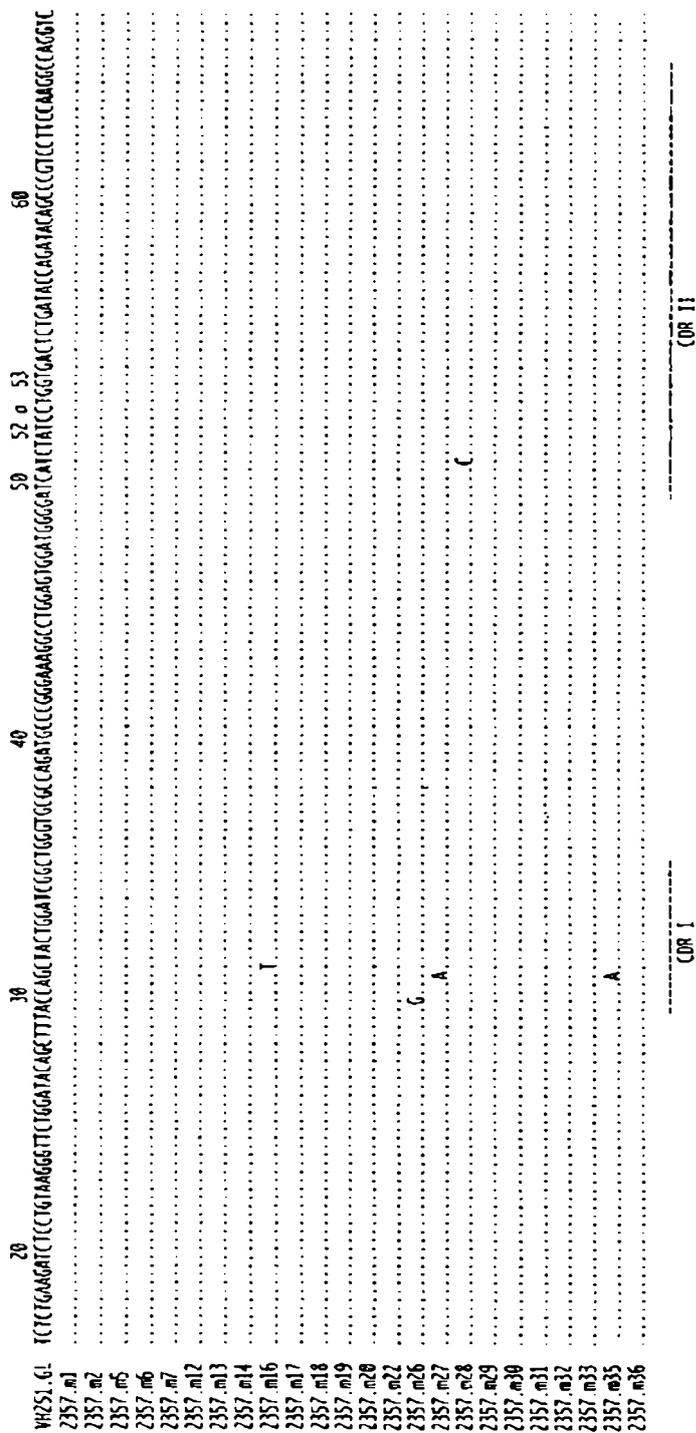


FIG. 67A

```

VRZSL.GL      20          30          40          50          52 o 53          60
TCTCTGAGATCTCTCTGAAAGGTTCTGGATACAGCTTTACAGCTACTGGATCGGCTGGGTCGCCAGATGCCCGGAGAGGCCCTGGAGTGGATGGGATCATCTATCCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCGCTCTCCAGGCCAGGTC
12          .....C.....6.....
2357.g5          .....C.....6.....
13
2357.g10
2357.g24
14          .....C.....6.....
2357.g1          .....T...T...GA.....C.....6.....
2357.g2          .....C.....6.....
2357.g3          .....T...G...A.....66.....
2357.g4          .....C.A.....
2357.g6          .....A.....
2357.g11          .....T...T...C.....A.....T.....
2357.g17          .....T...T...C.....A.....T.....
2357.g19          .....T...T...C.....A.....T.....
2357.g23          .....C...T.....
2357.g7          .....T...A...T...T.....
2357.g30          .....C...T.....
2357.g2          .....A...T...T.....
2357.g4          .....T...A...T...T.....
2357.g16          .....A.....C.....
15          .....A.....C.....
2357.g25
2357.g35
16          .....A...T...C.....A.....
2357.g18          .....C...T.....C.....
2357.g2          .....G...A.....T.....
2357.g28          .....T...T.....C.....
2357.g33          .....T...T.....C.....
COR 1
COR 11

```

FIG. 67B.1


```

20      28      30      40      50      52 o 53      60
VHSP1 GL  TCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCTATCTACTGGGTCCGCGAGGCTCCAGCCAGGGCTGGAGTGGGTGGCGAGTTATATCTATATGATGGAGCAATABATATACCGAGACTCCGTTGAGGGCCGATTTC
J2
5250.ln4 .....C.....C.....G
5250.ln5 .....C.....C.....G
5250.ln8 .....A..A..G..A..A.....GC.....G
5250.ln10 .....A..A..G..A..A.....GC.....G
5250.ln12 .....C.....A..G.....C.....T..G
5250.ln27 .....C.....T.....GC.....G
5250.ln115 .....C.....T..T.....C.....G
5250.ln118 .....C.....T..T.....C.....G
5250.ln202 .....A..A..G..A..A.....GC.....G
J4
5250.ln16 .....C.....
5250.ln19 .....C.....
5250.ln22 .....A.....A.....T.....
5250.sp26 .....A.....
5250.sp27 .....A.....
J6
5250.ln3 .....
5250.ln24 .....A.....
5250.sp19 .....A.....
5250.sp22 .....A.....G.....T.....C..A.....T.....A..
5250.sp28 .....TGGATGAGGTCCTCTGAGGGCTTCGGAGCACTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTCCGACAGGCCCTTCGACAGGGCTTCAGTGGATGGAGGATCATCTCCATCTTGGTATAGCAAACTAGCCAGAGTTCAGGGCAGAGTC
J3
5250.sp33 .....C.....A.....T.....
VH4_21 GL  ACCCTGCTCCCTCCGCTGTCTATGTTGGTCTTCAGTGGTACTACTGGAGCTGGATCCGACGCCCCGAGGCGAGGGCTGGATGGGGAATCAATCAT  AGTGGAGCACCCACTAACACCCGTCCTCAGAGTCCAGTTC
J4
5250.ln2 .....
5250.sp30 .....
5250.sp32 .....
----- CDR I -----
----- CDR II -----

```

FIG. 68A

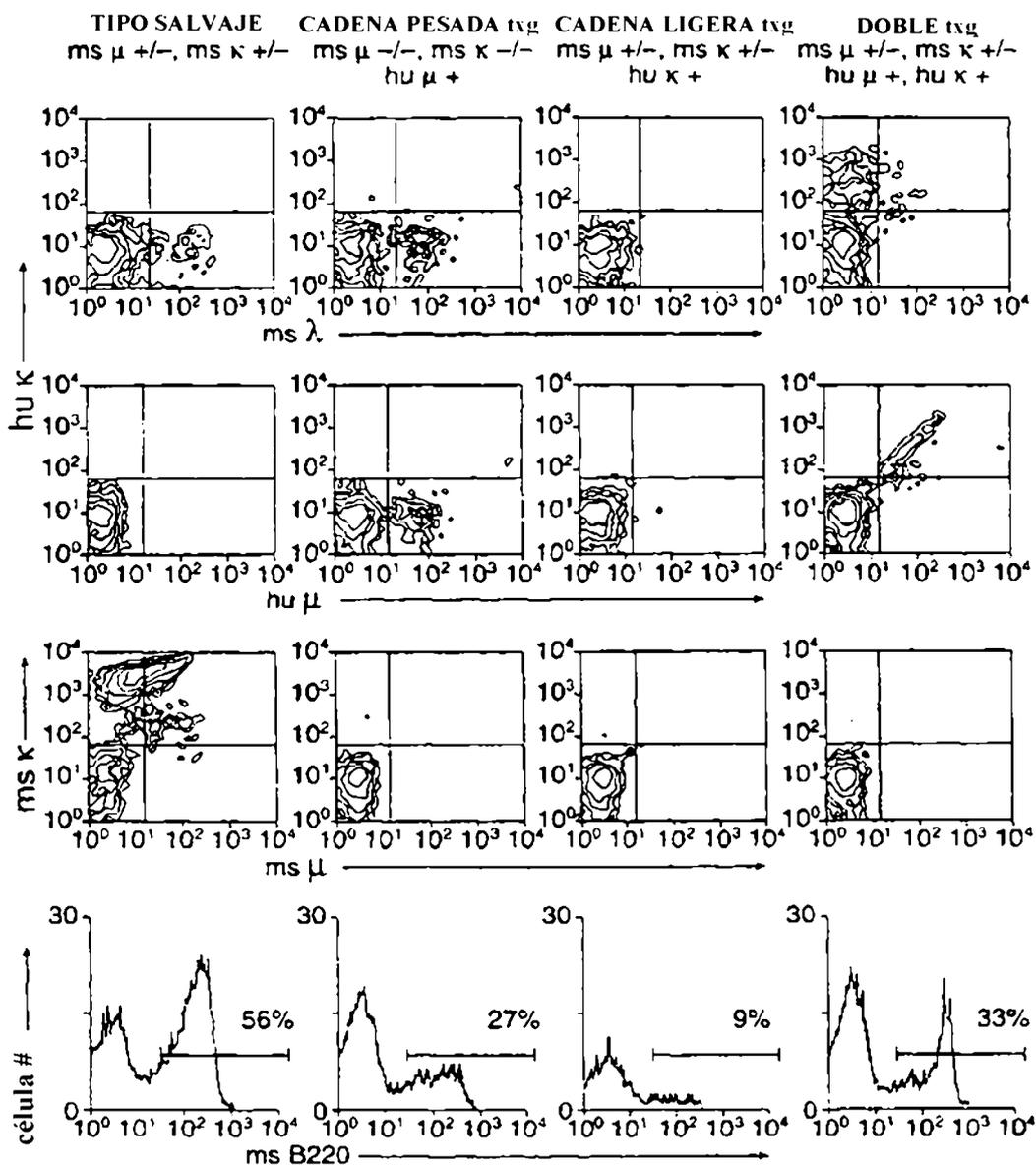


FIG. 69

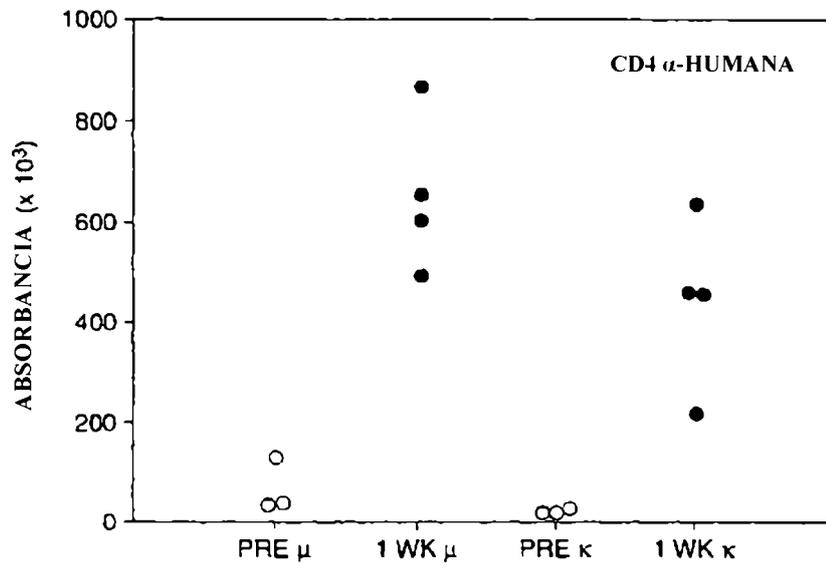


FIG. 71A

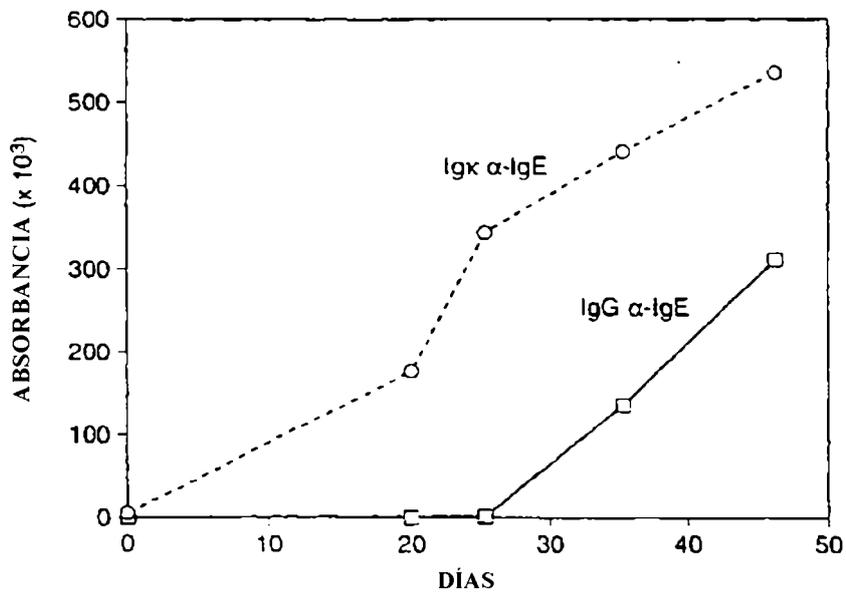


FIG. 71B

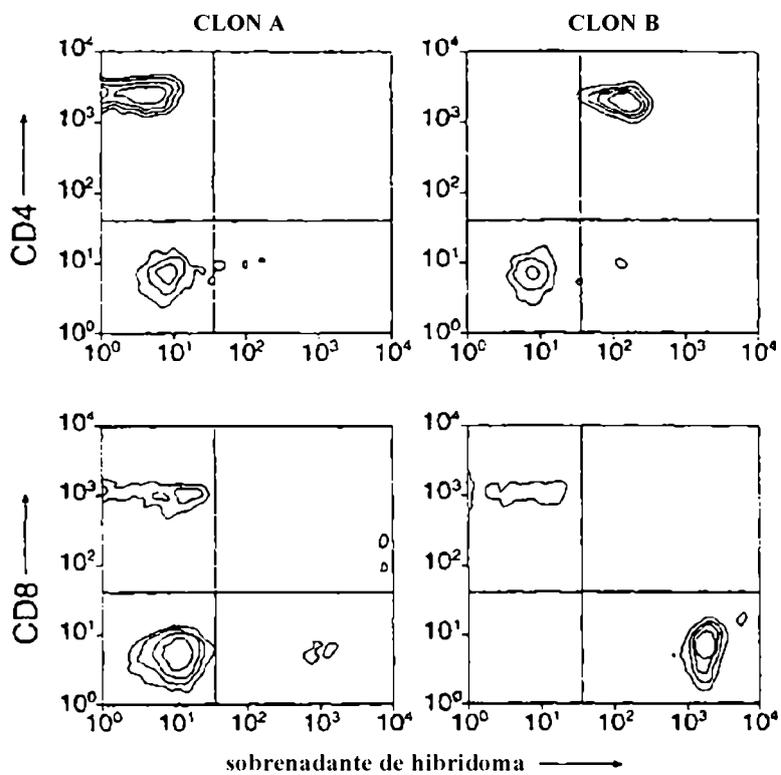


FIG. 72

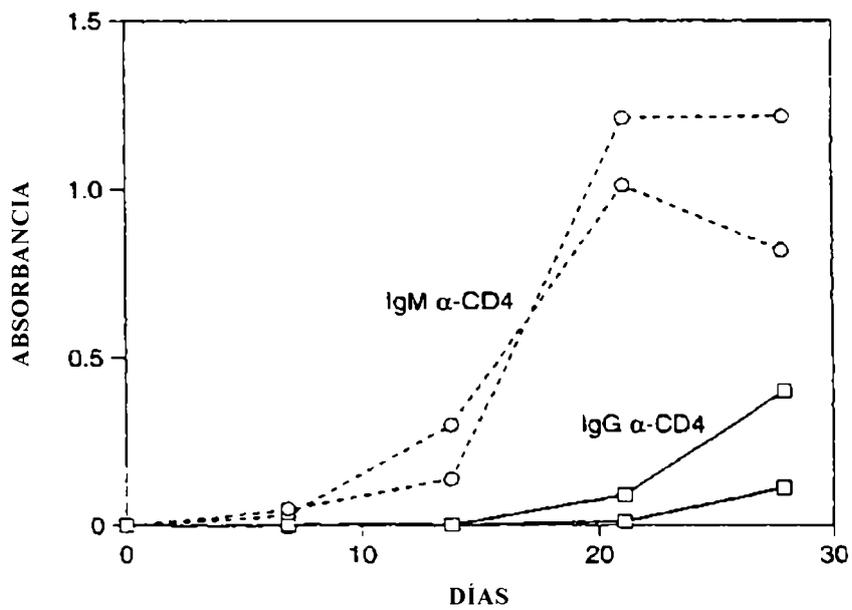


FIG. 73

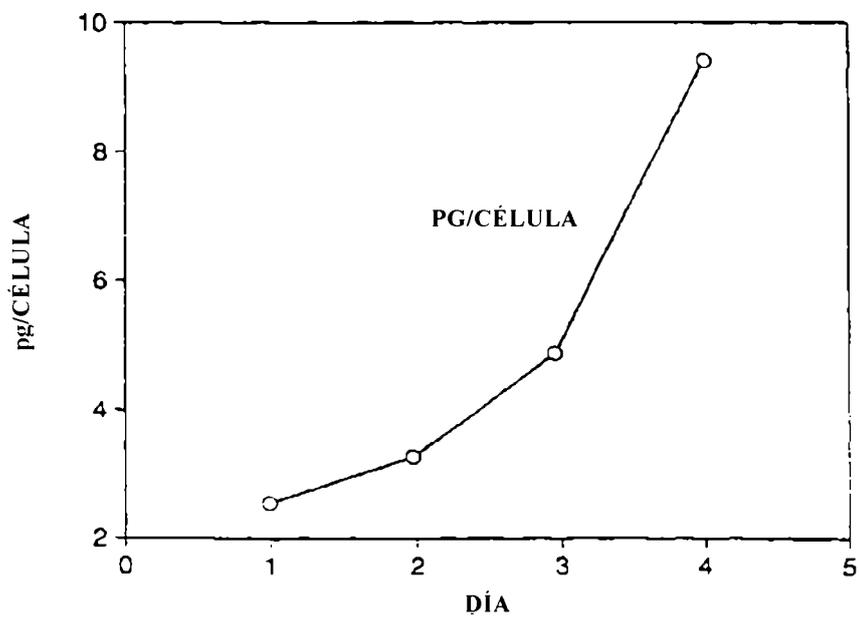
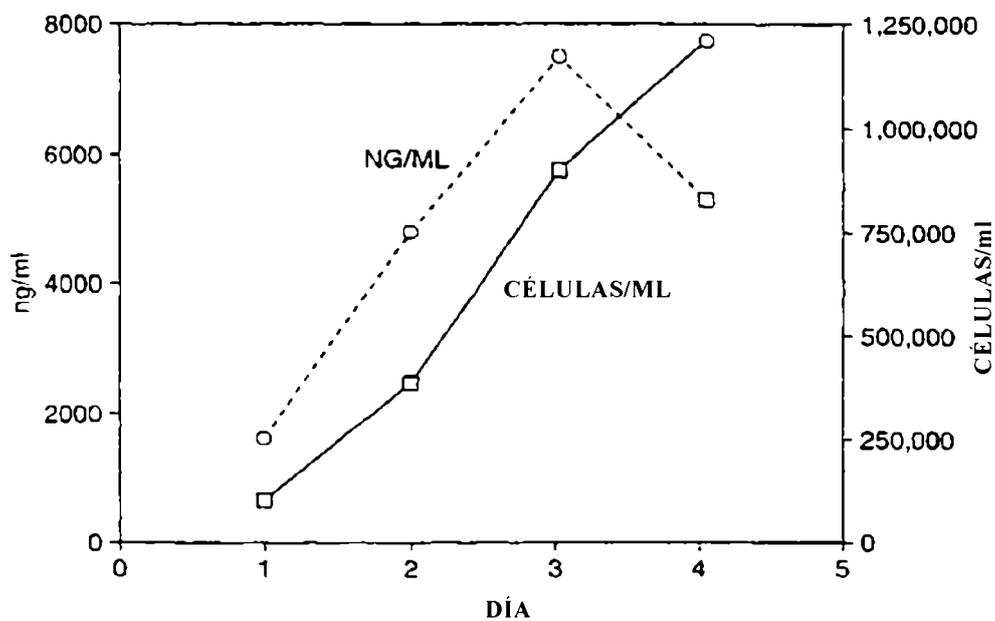
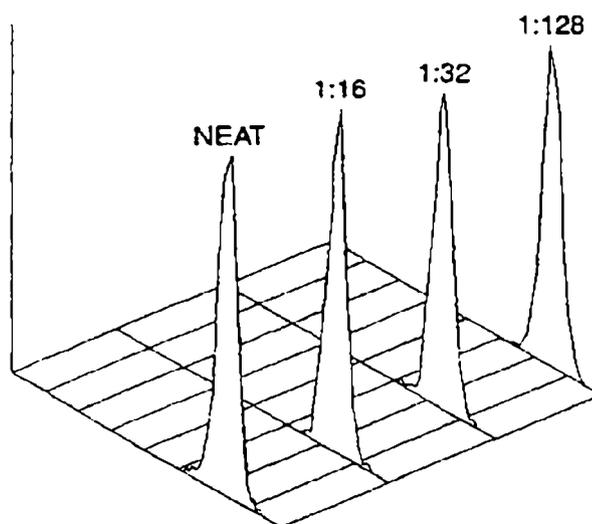


FIG. 74

RPA-T4/2C11-8
#12:BDPHARMCOMP004\FL2-H\FL2-ALTURA



Leu-3a/2C11-8
#12:BDPHARMCOMP025\FL2-H\FL2-ALTURA

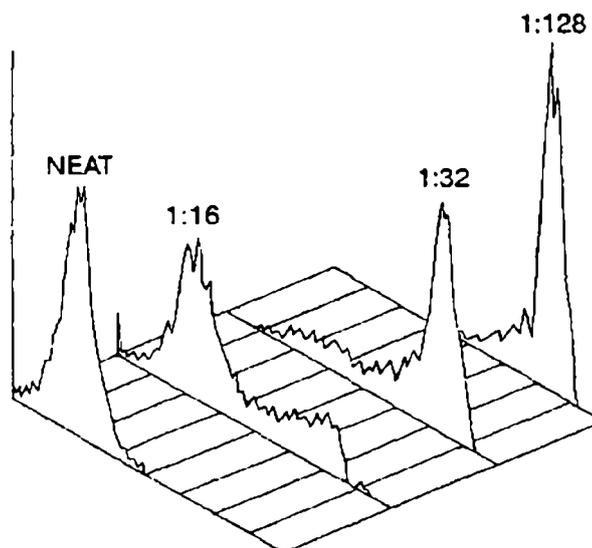


FIG. 75

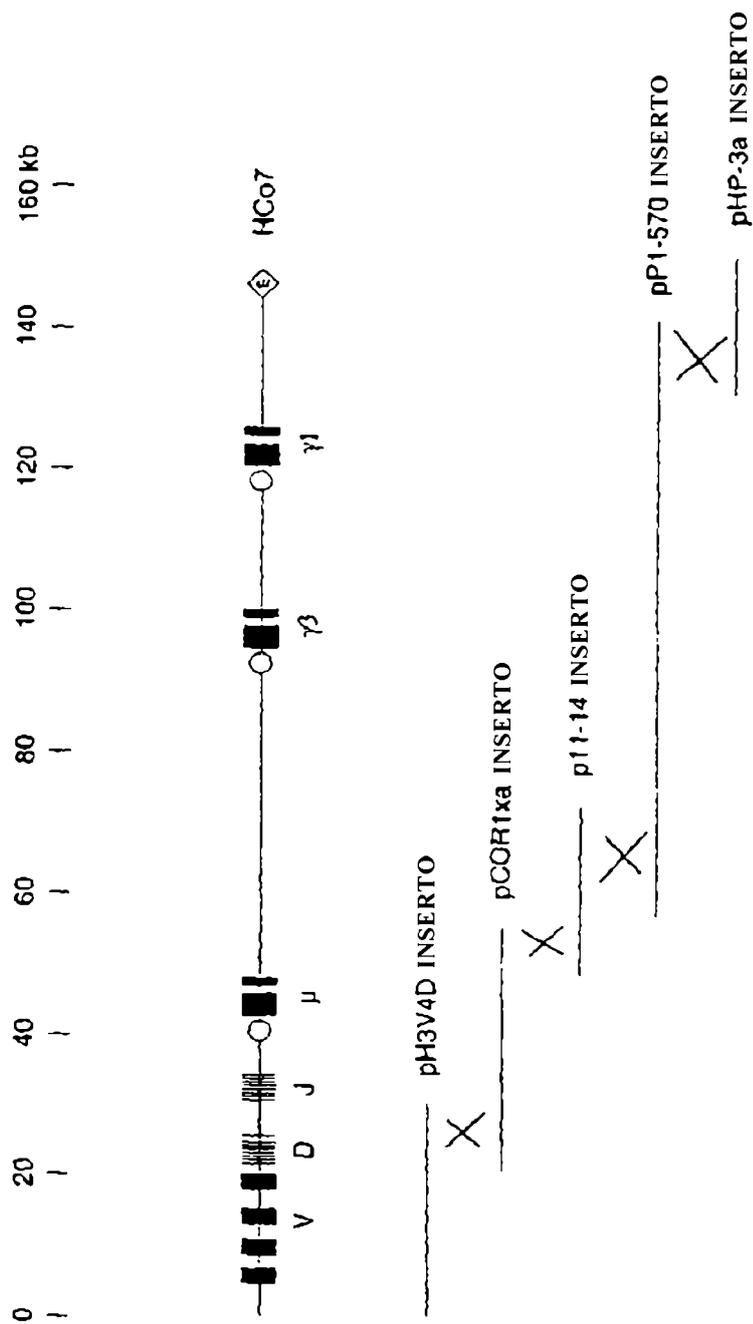


FIG. 76

Secuencia de pGP2b:

AATTAGCggccgctgtcgacaagcttcgaattcagtatcgatgtggtacctggatcctcgagtgcGGCCGAGTATGCAA
 AAAAAAGCCCGCTCATTAGCGGGCTCTTGGCAGAACATATCCATCGCGTCCGCCATCTCCAGCAGCCGACCGCGGCA
 TCTCGGGCAGCGTTGGGTCTGGCCACGGGTGCGCATGATCGTGCTCCTGTCTGGAGACCCGGCTAGGCTGGCGGGT
 TGCCTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCGATACGGCAGCGAACGTGAAGCGACTGTGCTGCAAAAACGCTGCGACCTG
 AGCAACAACATGAATGGTCTTCGGTTCCGTGTTCCGTAAAGTCTGGAAACGGGAAGTCAGCGCCCTGCACCATTATGT
 TCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGCTACCCTGTGGAACACCTACATCTGTATTAAACGAAGCGCTGCCATTGACCC
 TGAGTGATTTTTCTCTGGTCCCGCCGCATCCATACCGCCAGTTGTTTACCCCTCACAACGTTCCAGTAACGGGCATGTTT
 ATCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCATCCTCTCTCGTTTCATCGGTATCATTACCCCATGAACAGAAATTCGCCCTTAC
 ACGGAGGCATCAAGTGACCAACAGGAAAAACCGCCCTAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTC
 TGGAGAACTCAACGAGCTGGACCGCGATGAACAGCGAGACATCTGTGAATCGCTTACGACCACGCTGATGAGCTTTAC
 CGCAGCTGCCTCGCGCTTTCGGTGTGACGGTGAACCTTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCAAGCTTGTCT
 GTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCGTGAGGGCGCTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCAGCCATGACCC
 AGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTACTGGCTTAACTATGGCGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGC
 GGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTE
 CGCTCGGTCTGCTCGGCTGCGCGAGCGGTATCAGCTCAAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAA
 CGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGCCAGCAAAAGCCAGGAACCGTAAAAAGCCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATA
 GGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGACTATAAAGATAC
 CAGCGCTTCCCGCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTCCGACCTCCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCT
 CCTTCCGGAAGCGTGGCGTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCAAGCTGG
 GCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAAACCGGTAAGA
 CACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCAggcgccccttggcctaagaggccaCTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGSTA
 TGTAGGGCGGTGTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGTGTATCTGCGCTC
 TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGTATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTT
 TTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACCGCGAAGAAAAAGGATCTCAAGAAGATCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGC
 TCAGTGGAAACGAAAACCTCAGTTAAGGATTTTGGTATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCTTTTAAATT
 AAAAAAGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCA
 CCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTCCATAGTTGCCCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGG
 CTTAACCATCTGGCCACAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACCGTCCACCGGCTCAGATTATCAGCAATAAACACGC
 CAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATGTGTCGGGAAGCT
 AGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTGCCATTGCTGACGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTT
 TGSTATGGCTTCATTACAGTCCGGTTCCTAACGATCAAGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTA
 GCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTTTCAGAAAGTAAAGTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAT
 TCTCTACTCTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTAT
 CGGGCAGCCAGTTGCTCTTCCCGGGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGTCTATCA
 TTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCA
 CCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAA
 GGAATAAGGGCGCACGGAATCTTGAATCTCATACTCTTCTTTTCAATATTATGAAGCATTTATCAGGGTTATT
 GTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGCAAAAGTG
 CCACCTGACGCTAAGAAACCAATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGCTTCA
 AG

FIG. 77A

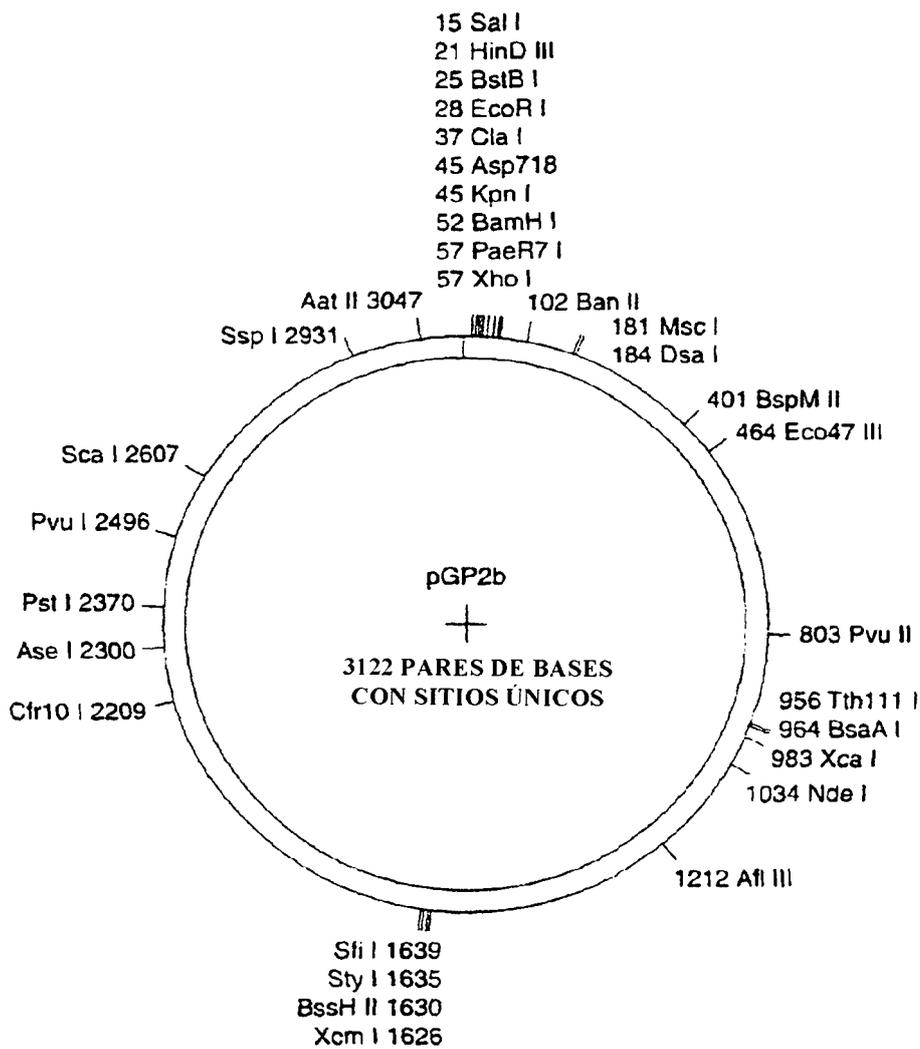


FIG. 77B

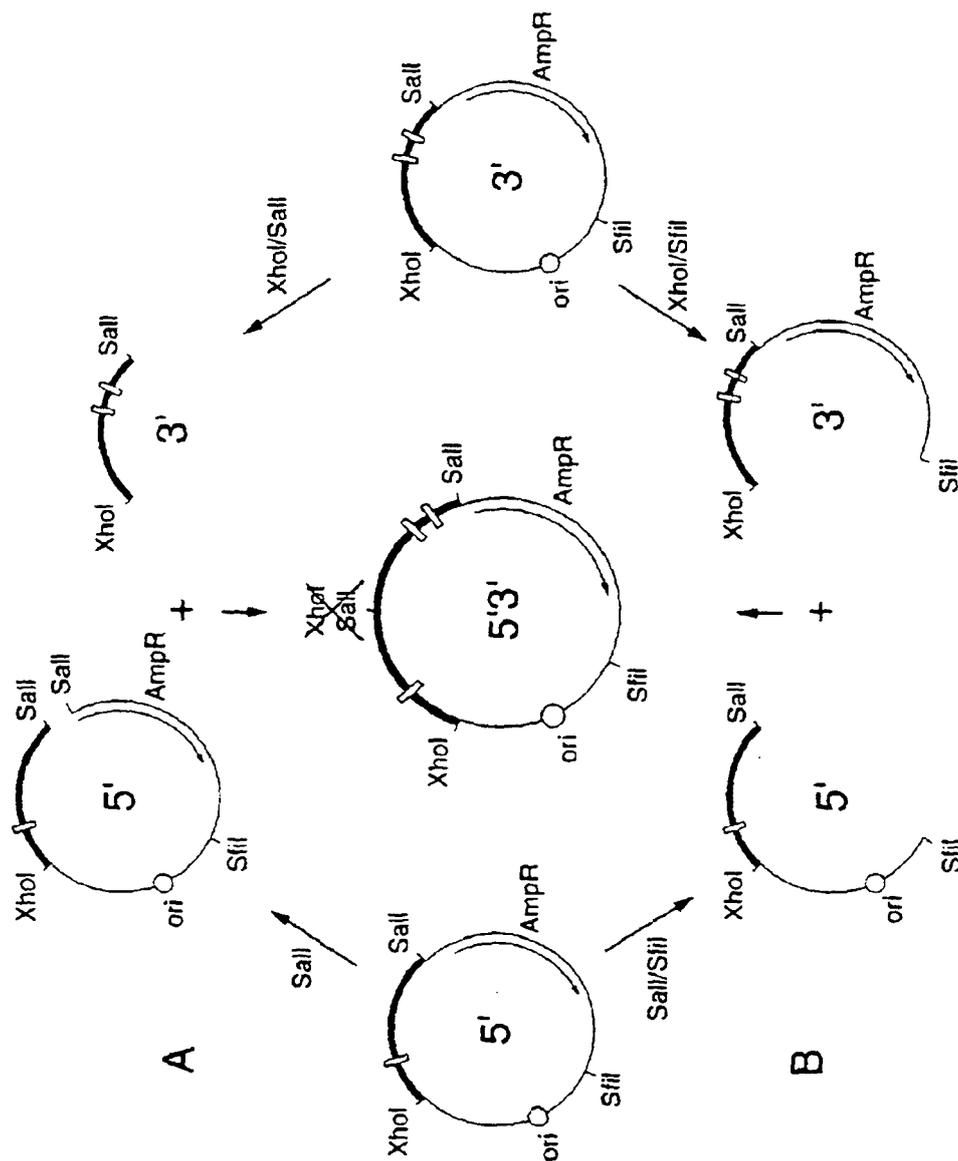


FIG. 78

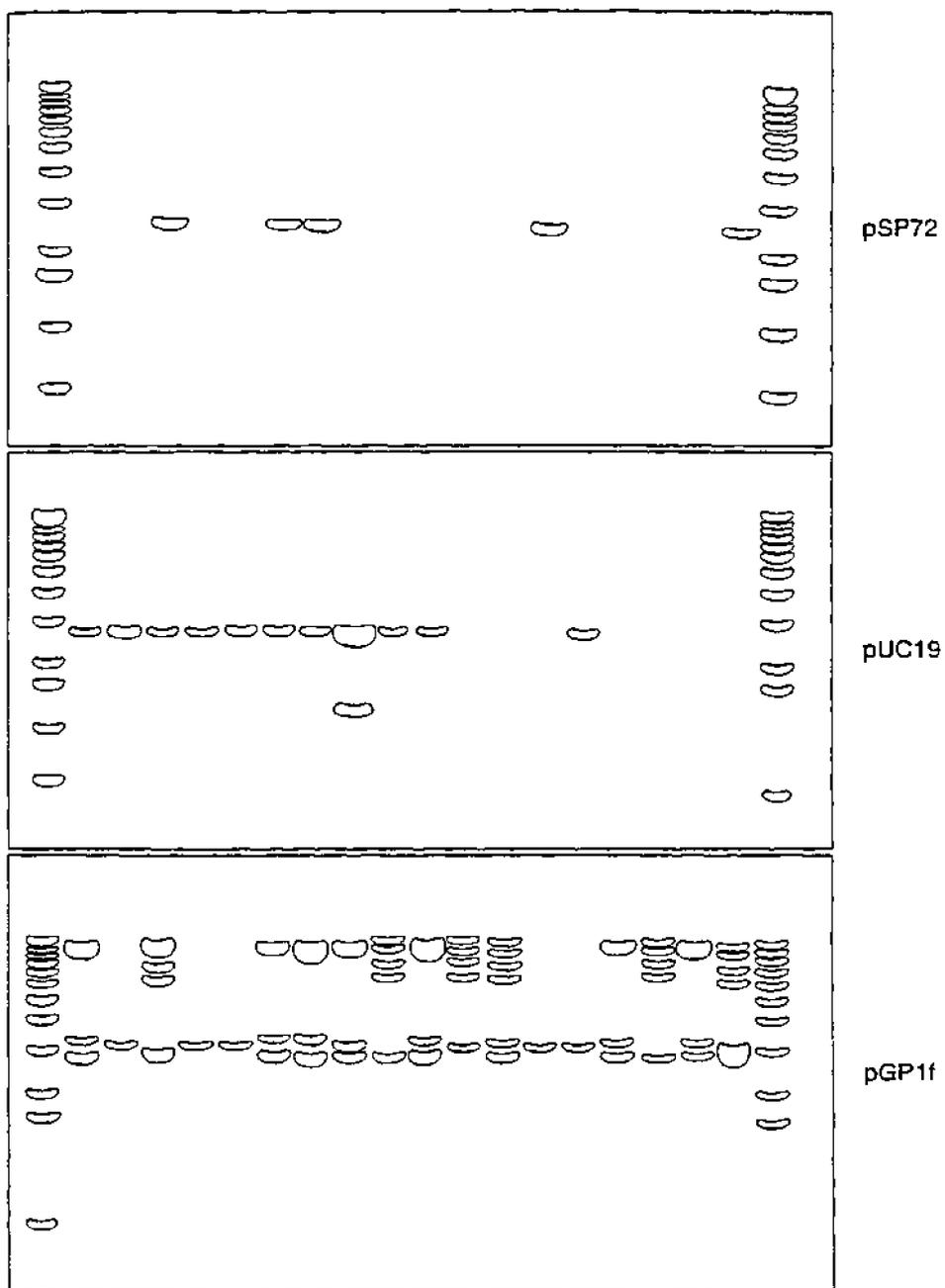


FIG. 79

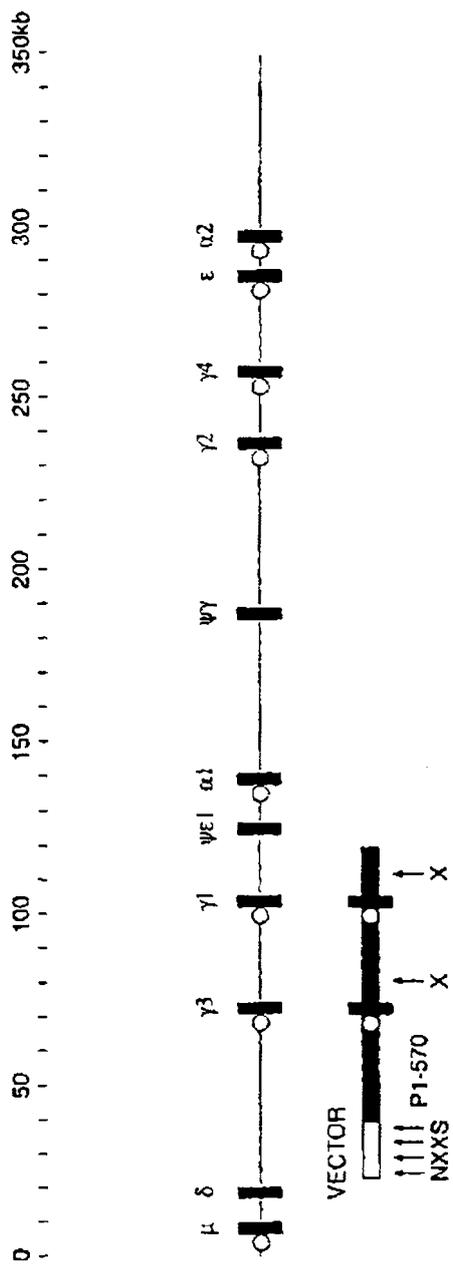


FIG. 80

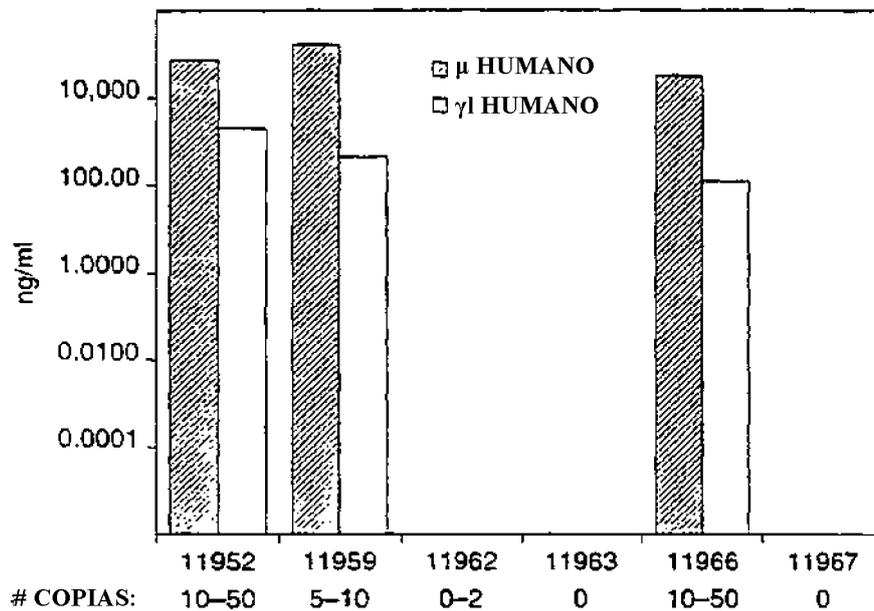


FIG. 81

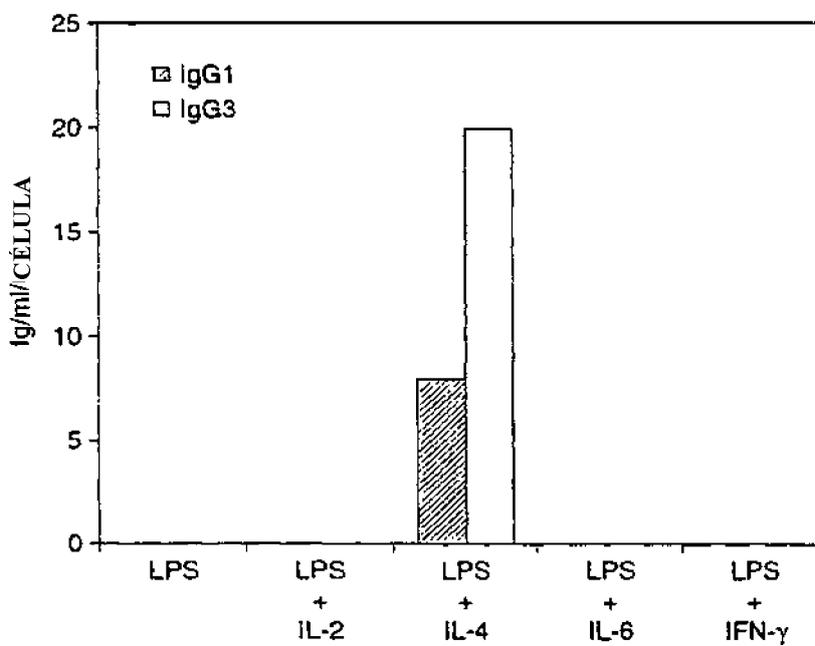


FIG. 84

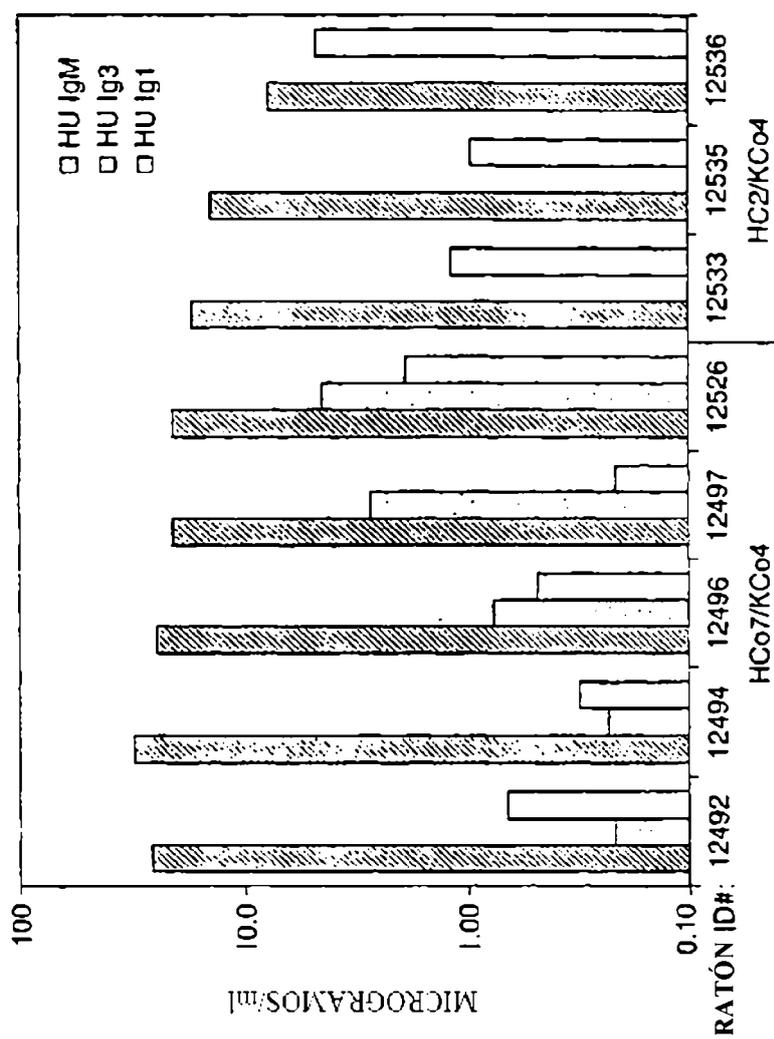


FIG. 82

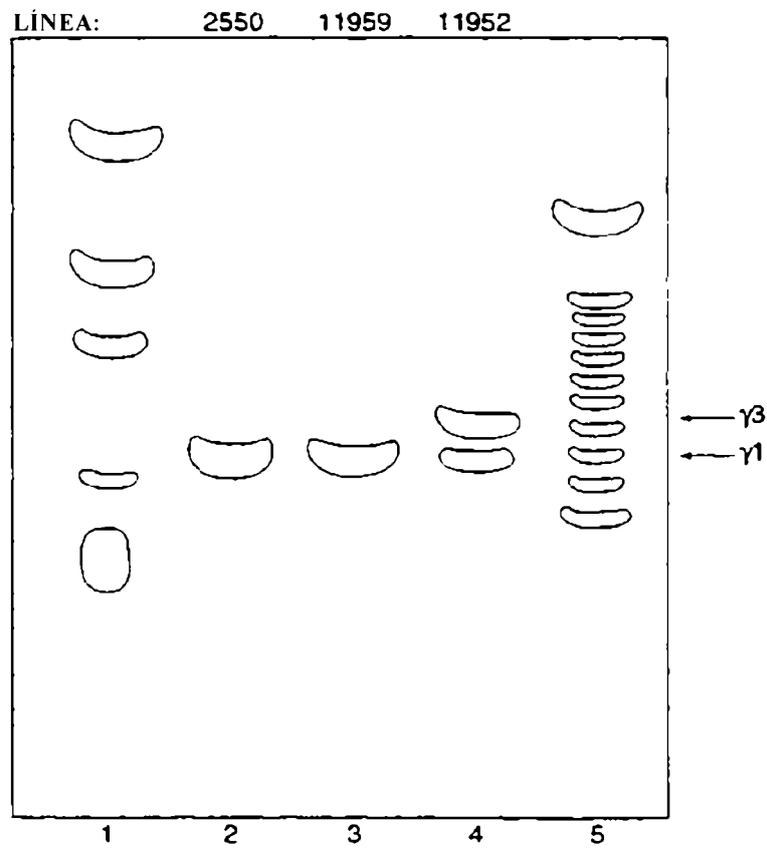


FIG. 83

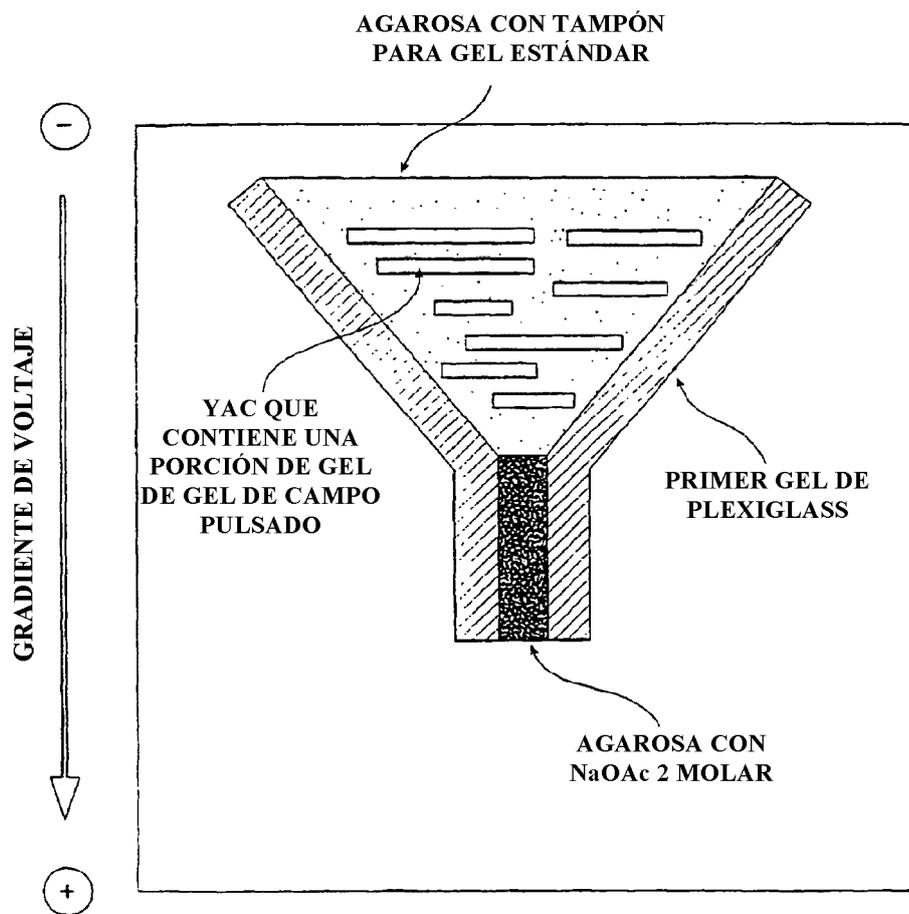


FIG. 85

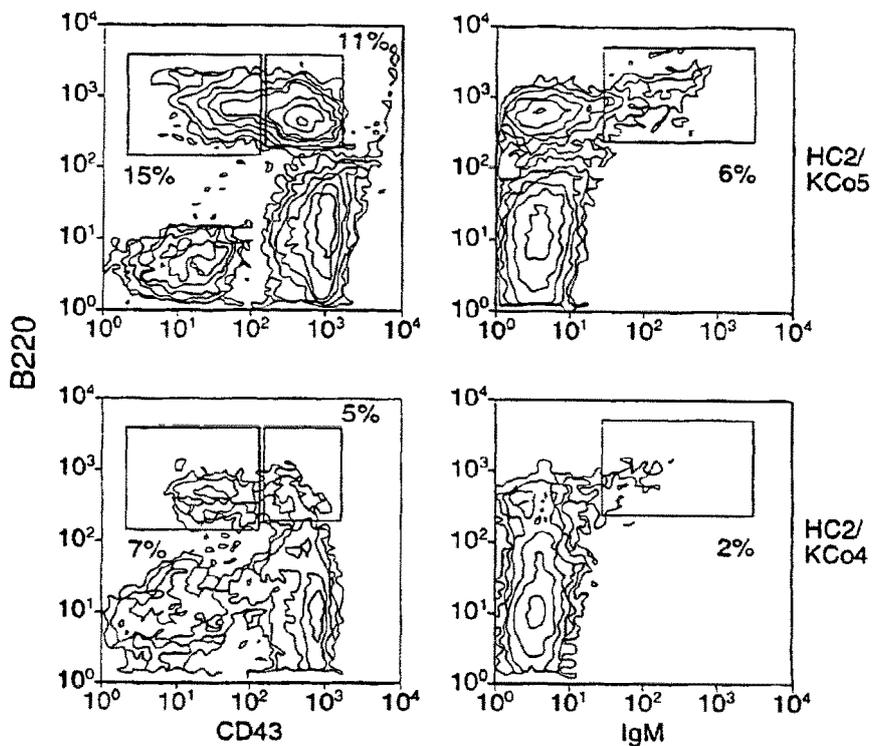


FIG. 86

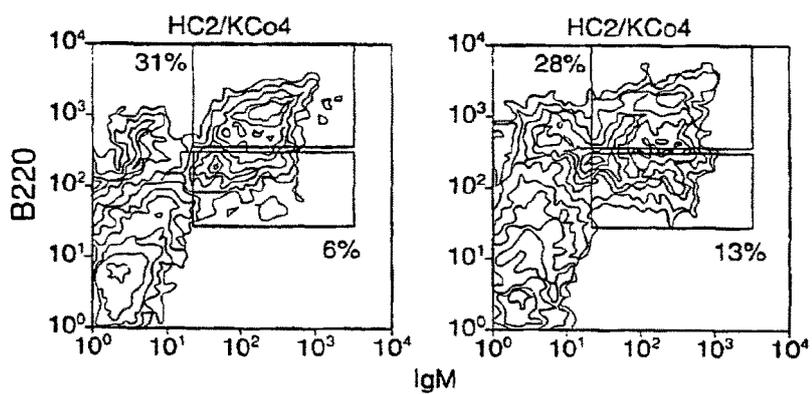


FIG. 87

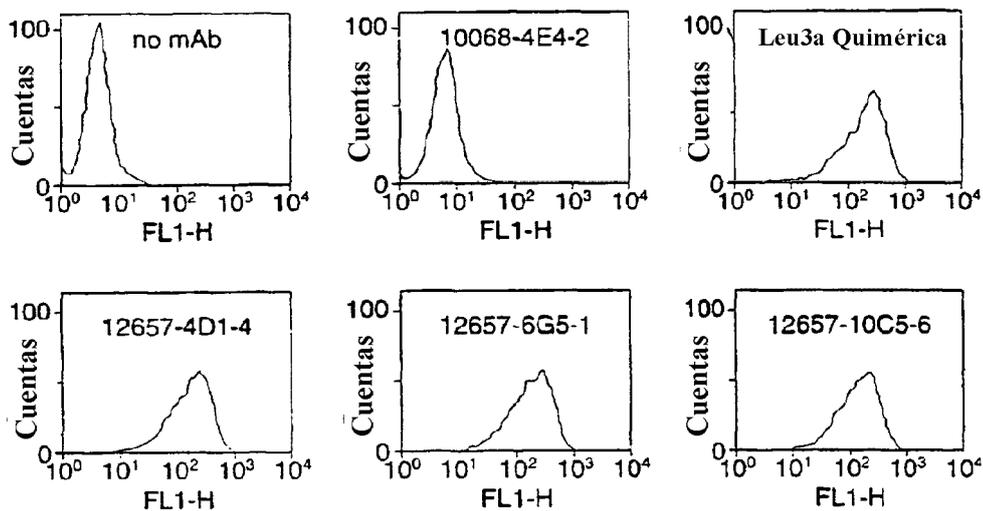


FIG. 88

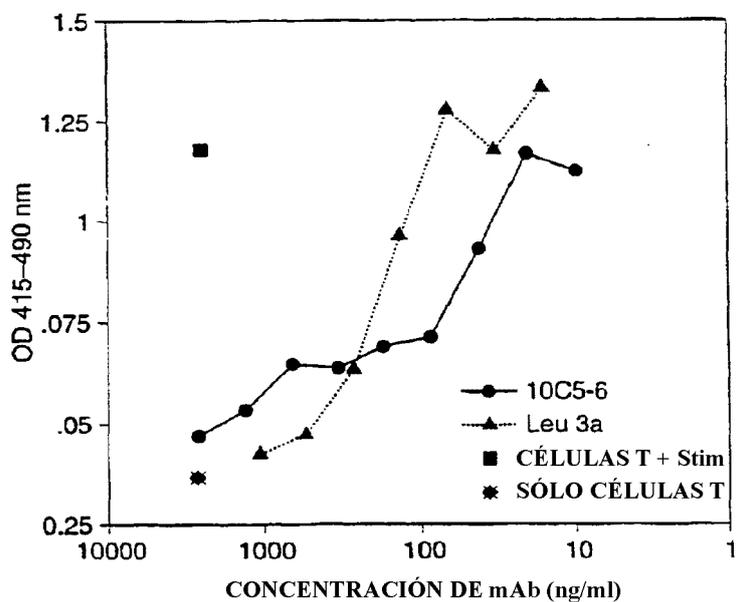


FIG. 90

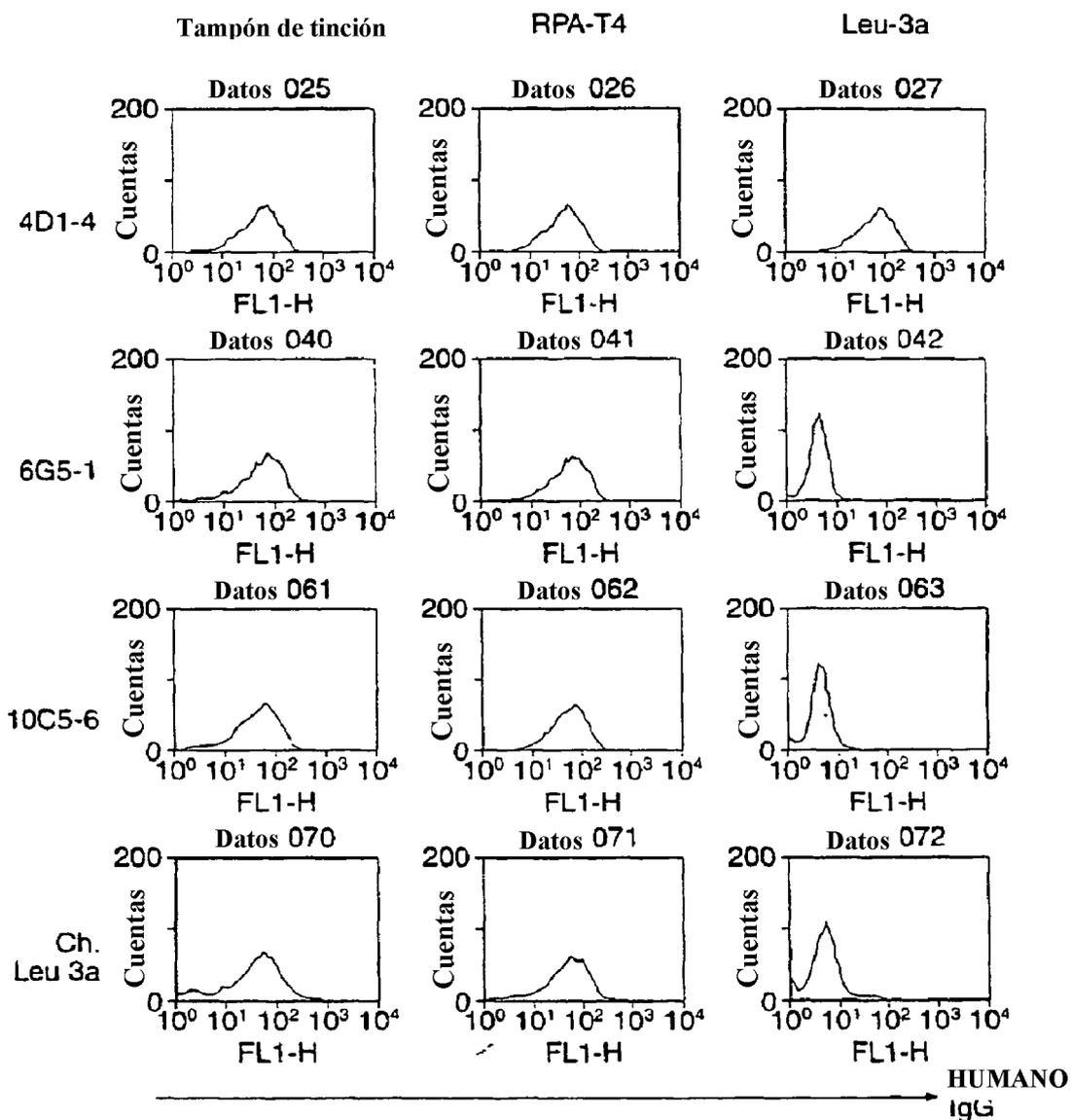


FIG. 89

ES 2 345 580 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: GenPharm International, Inc.
 - (B) CALLE: 2350 Qume Drive
 - 10 (C) CIUDAD: San Jose
 - (D) ESTADO: California
 - (E) PAÍS: USA
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 95131
 - 15 (G) TELÉFONO: (908) 713-6001
 - (H) TELEFAX: (908) 713-6002
 - (I) TELEX:
- 20 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: Lonberg, Nils
 - (B) CALLE: 930 Edgecliff Way
 - 25 (C) CIUDAD: Redwood CIUDAD
 - (D) ESTADO: California
 - (E) PAÍS: USA
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 94601
 - 30 (G) TELÉFONO:
 - (H) TELEFAX:
 - (I) TELEX:
- 35 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: Kay, Robert M.
 - (B) CALLE: 2127 Broadway #5
 - 40 (C) CIUDAD: San Francisco
 - (D) ESTADO: California
 - (E) PAÍS: USA
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 94115
 - 45 (G) TELÉFONO:
 - (H) TELEFAX:
 - (I) TELEX:
- 50 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Aninales transgénicos no humanos capaces de producir anticuerpos heterólogos
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 416
- 55 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: Townsend and Townsend and Crew LLP
 - (B) CALLE: Two Embarcadero Center, Eighth Floor
 - 60 (C) CIUDAD: San Francisco
 - (D) ESTADO: California
 - (E) PAÍS: USA
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 94111-3834
- 65 (v) FORMATO DE LECTURA PARA ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Diskette

ES 2 345 580 T3

- (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

5

(vi) DATOS DE SOLICITUD ACTUAL:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: WO PCT/US96/16433
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 10-OCT-1996
- (C) CLASIFICACIÓN:

10

(vii) DATOS DE SOLICITUD PREVIA:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/544,404
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 10-OCT-1995

15

(viii) INFORMACIÓN AGENTE/ABOGADO:

- (A) NOMBRE: Apple, Randolph T.
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 36,429
- (C) NÚMERO DE REFERENCIA/ARCHIVO: 014643-009020PC

20

(ix) INFORMACIÓN PARA TELECOMUNICACIÓN:

- (A) TELÉFONO: (415) 576-0200
- (B) TELEFAX: (415) 576-0300

25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 10 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

30

35

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

40

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:1:

CTAADTGGGG 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 5 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

45

50

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

55

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:2:

Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

60

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 5 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA:

65

ES 2 345 580 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:3:

Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:4:

Gly Ala Phe Asp Ile
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 4 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:5:

Lys Glu Arg Val
1

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 4 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:6:

Asn Asp Ser Val
1

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 345 580 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: RNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:7:

AAAGAAAGAG UU 12

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 12 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

15

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: RNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:8:

20

AACGACAGCG UU 12

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

25

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

30

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:9:

35

GAGCTGAGCT GGGGT 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

40

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

45

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:10:

50

GAGCTGAGCT GAGCTGGGGT 20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

55

(A) LONGITUD: 25 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

60

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:11:

65

GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GGGGT 25

ES 2 345 580 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:12:

GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGGGGT 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 35 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:13:

GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GGGGT 35

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:14:

GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGGGGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:15:

GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GGGGT 45

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

ES 2 345 580 T3

(A) LONGITUD: 50 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:16:

10 GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGGGGT 50

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:17:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 55 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:17:

GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GGGGT 55

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:18:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 60 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

35

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

40

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:18:

GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGGGGT 60

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 65 pares de bases

50

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

55

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:19:

GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT 60

60

GGGGT 65

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:20:

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 70 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 345 580 T3

- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:20:

GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT 60

GAGCTGGGGT 70

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 75 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:21:

GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT 60

GAGCTGAGCT GGGGT 75

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 80 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) STRANDEDNESS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:22:

GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT 60

GAGCTGAGCT GAGCTGGGGT 80

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 85 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:23:

GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT 60

GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GGGGT 85

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

ES 2 345 580 T3

- (A) LONGITUD: 90 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
5 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:24:
10 GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT 60
GAGCTGAGCT GAGCTGAGCT GAGCTGGGGT 90
- 15 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:25:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 12 pares de bases
20 (B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:25:
25 AATTGCGGCC GC 12
- 30 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:26:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 45 pares de bases
35 (B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:26:
40 CTTGAGCCCG CCTAATGAGC GGGCTTTTTT TTGCATACTG CCGCC 45
- 45 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:27:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 51 pares de bases
50 (B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
55 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:27:
60 GCAATGGCCT GGATCCATGG CGCGCTAGCA TCGATATCTA GAGCTCGAGC A 51
- (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:28:
- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 51 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 345 580 T3

- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:28:

TGCAGATCTG AATTCCCGGG TACCAAGCTT ACGCGTACTA GTGCGGCCGC T 51

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:29:

AATTAGCGGC CGCACTAGTA CGCGTAAGCT TGGTACCCGG GAATT 45

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 51 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:30:

CAGATCTGCA TGCTCGAGCT CTAGATATCG ATGCTAGCGC GCCATGGATC C 51

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 51 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:31:

AGGCCATTGC GGCCGCAGTA TGCAAAAAA AGCCCGCTCA TTAGGCGGGC T 51

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 345 580 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:32:

5 CGCGTGGCCG CAATGGCCA 19

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:33:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:33:

CTAGTGGCCA TTGCGGCCA 19

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:34:

40 CAGGATCCAG ATATCAGTAC CTGAAACAGG GCTTGC 36

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:35:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

50 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:35:

55 GAGCATGCAC AGGACCTGGA GCACAGACAG CCTTCC 36

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:36:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

65 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 345 580 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:36:

5 GGACTGTGTC CCTGTGTGAT GCTTTTGATG TCTGGGGCCA AG 42

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:37:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:37:

CACCAAGTTG ACCTGCCTGG TCACAGACCT GACCACTAT GA 42

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:38:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:38:

40 CCTGTGGACC ACCGCCTCCA CCTTCATCGT CCTCTTCCTC CT 42

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:39:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

50 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:39:

TGAGCCACGA AGACCCTGAG GTCAAGTTCA ACTGGTACGT GG 42

60 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:40:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

65 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 345 580 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:40:

5 TGGTATTACT ATGGTTGGG GAGTTATTAT AACCACAGTG TC 42

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:41:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:41:

20 GCCTGAAATG GAGCCTCAGG GCACAGTGGG CACGGACACT GT 42

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:42:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:42:

35 GCAGGGAGGA CATGTTTAGG ATCTGAGGCC GCACCTGACA CC 42

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:43:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

45 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:43:

GATCCTGGTT TAGTTAAAGA GGATTTTATT CACCCCTGTG TC 42

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:44:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

65 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

ES 2 345 580 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:44:

GATCCAAGCA GT 12

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:45:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:45:

CTAGACTGCT TG 12

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:46:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 12 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:46:

35 **CGCGTCGAAC TA 12**

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:47:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

40 (A) LONGITUD: 12 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

45 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:47:

50 **AGCTTAGTTC GA 12**

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:48:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

60 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:48:

65 **GAATGGGAGT GAGGCTCTCT CATAACCTAT TCAGAACTGA CT 42**

ES 2 345 580 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:49:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:49:

GAACTGTGGC TGCACCATCT GTCTTCATCT TCCCGCCATC TG 42

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:50:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:50:

GAGGTACACT GACATACTGG CATGCCCCCC CCCCCC 36

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:51:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 60 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:51:

GTACGCCATA TCAGCTGGAT GAAGTCATCA GATGGCGGGA AGATGAAGAC AGATGGTGCA 60

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:52:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:52:

TCATCAGATG GCGGGAAGAT GAAGACAGAT GGTGCA 36

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:53:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

ES 2 345 580 T3

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:53:

GTACGCCATA TCAGCTGGAT GAAG 24

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:54:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:54:

GAGGTACACT GACATACTGG CATG 24

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:55:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 60 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:55:

GTACGCCATA TCAGCTGGAT GAAGACAGGA GACGAGGGGG AAAAGGGTTG GGGCGGATGC 60

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:56:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:56:

ACAGGAGACG AGGGGGAAAA GGGTTGGGGC GGATGC 36

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:57:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 345 580 T3

- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:57:

GTACTCCATA TCAGCTGGAT GAAG 24

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:58:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:58:

GGCTGATGCT GCACCAACTG TATCCATCTT CCCACCATCC AG 42

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:59:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:59:

CTCACGTTCC GTGCTGGGAC CAAGCTGGAG CTGAAACGTA AG 42

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:60:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:60:

ACTATGCTAT GGACTACTGG GGTCAAGGAA CCTCAGTCAC CG 42

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:61:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 59 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 345 580 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:61:

5 **GGCCGCTCGA CGATAGCCTC GAGGCTATAA ATCTAGAAGA ATTCCAGCAA AGCTTTGGC** 59

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:62:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 48 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:62:

CAAGAGCCCG CCTAATGAGC GGGCTTTTTT TTGCATACTG CGGCCGCT 48

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:63:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 48 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:63:

40 **AATTAGCGGC CGCAGTATGC AAAAAAAAAAGC CCGCTCATTG GCGGGGCT** 48

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:64:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 59 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

50 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:64:

GCGGCCGCT CGAGTCACT ATCGATTPAT TAAGGATCCA GCAGTAAGCT TGCGGCCGC 59

60 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:65:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 53 pares de bases

65 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 345 580 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:65:

5 GCGGCCGCAT CCCGGGTCTC GAGGTCGACA AGCTTTCGAG GATCCGCGGC CGC 53

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:66:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 47 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:66:

GCGGCCGCTG TCGACAAGCT TATCGATGGA TCCTCGAGTG CGGCCGC 47

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:67:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 65 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:67:

40 GCGGCCGCTG TCGACAAGCT TCGAATTCAG ATCGATGTGG TACCTGGATC CTCGAGTGCG 60

GCCGC 65

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:68:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 51 pares de bases

50 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:68:

60 GGCCGCAAGC TTA CTGCTGG ATCCTTAATT AATCGATAGT GATCTCGAGG C 51

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:69:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

65 (A) LONGITUD: 51 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 345 580 T3

- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:69:

GGCCGCCTCG AGATCACTAT CGATTAATTA AGGATCCAGC AGTAAGCTTG C 51

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:70:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 39 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:70:

CTCCAGGATC CAGATATCAG TACCTGAAAC AGGGCTTGC 39

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:71:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 39 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:71:

CTCGAGCATG CACAGGACCT GGAGCACACA CAGCCTTCC 39

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:72:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 3618 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE: -
- (B) UBICACIÓN: 1..3618
- (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "vector pGPe"

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:72:

ES 2 345 580 T3

	AATTAGCGGC CGCCTCGAGA TCACTATCGA TTAATTAAGG ATCCAGATAT CAGTACCTGA	60
5	AACAGGGCTG CTCACAACAT CTCTCTCTCT GTCTCTCTGT CTCTGTGTGT GTGTCTCTCT	120
	CTGTCTCTGT CTCTCTCTGT CTCTCTGTCT CTGTGTGTGT CTCTCTCTGT CTCTCTCTCT	180
	GTCTCTCTGT CTCTCTGTCT GTCTCTGTCT CTGTCTCTGT CTCTCTCTCT CTCTCTCTCT	240
10	CTCTCTCTCT CTCTCTCTCA CACACACACA CACACACACA CACACCTGCC GAGTGACTCA	300
	CTCTGTGCAG GGTGGCCCT CGGSSCACAT SCBAATGGAT GTTTGTCCA TGCAGAAAA	360
15	CATGTTTCTC ATTCTCTGAG CCAAAAATAG CATCAADGAT TCCCCACCC TGCAGCTGCA	420
	GGTTCACCCC ACCTGGCCAG GTTGACCAGC ITGGGGATG GGGCTGGGG TTCCATGACC	480
20	CCTAACGGTG ACATTGAAT CAGTGTTTTC CGATTTATCG ACACTCCTGG AATGTGACCC	540
	TAGGAGGGAA TGACAGGAGA TAGGCAAGGT CCAACACCC CAGGGAAGTG GSAGAGACAG	600
	GAAGGCTGTG TGTGCTCCAG GTCCTGTGCA TGCTGCAGAT CTGAATPCCC GGGTACCAAG	660
25	CTTGGGCGCG CAGTATGCAA AAAAAAGCCC GCTCATTAGG CGGGCTCTTG GCAGAACATA	720
	TCCATCGCGT CCGCCATCTC CAGCAGCCGC ACGCGGCGCA TCTCGGGCAG CGTGGGTCC	780
30	TGGCCACGGG TGGCATTGAT CGTCTCTCTG TCGTTGAGGA CCGGGCTAGG CTGGCGGGGT	840
	TGCCTTACTG GTTAGCAGAA TGAATCACCG ATACGGGAGC GAACGTGAAG CGACTGCTEC	900
35	TGCAAAACCT CTGGACCTG AGCAACAACA TGAATGCTCT TCGTTTCCG TGTTCGTAA	960
	AGTCTGGAAA CGGGGAAGTC AGCGCCCTGC ACCATTATGT TCCGGATCTG CATCGCAGGA	1020
	TGCTGCIGGC TACCCTGTGG AACACCTACA TCTGTATTAA CGAAGCGCTG GCATTGACCC	1080
40	TGAGTGATTT TTCTCTGGTC CCGCCGATC CATAACGCCA GTTGTTTACC CTCACAACGT	1140
	TCCAGTAACC GGGCATGTTT ATCATCAGTA ACCCGTATCG TCAAGATCCT CTCTCGTTTC	1200
45	ATCGGTATCA TTACCCCAT GAACAGAAAT TCCCCTTAC ACGGAGGCAT CAAGTGACCA	1260
	AACAGGAAA AACCGCCCTT AACATGGCCG GCTTTATCAG AAGCCAGACA TTAACGCTTC	1320
50	TGGAGAACT CAACGAGCTG GACGCGGATG AACAGGCAGA CATCTGTGAA TCGCTTCACG	1380
	ACCACGCTGA TGAGCTTTAC CGCAGCTGCC TCGCGGTTT CGGIGATGAC GGTGAAAACC	1440
	TCTGACACAT GCAGCTCCCG SAGACGGTCA CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCGGGSAGCA	1500
55	GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGCTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC	1560
	AGTCACGTAG CGATAGCGGA GTSTATACTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG AGCAGATCTG	1620

60

65

ES 2 345 580 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ACCGAGAGTG CACCATAATG GGTGTGAAT ACCGCACAGA TCGTAAGGA GAAATACCC 1680
 CATCAGGGGC TCTTCGGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGCTCGGTGG TCGGCTGCG 1740
 BCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAABGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAA7 CAGGGGATAA 1800
 CGCAGCAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC 1860
 GTTGCTGGCG TTTTCCATA GGCTCGGCC CCTGACGAG CATCACAAA AICGACGCTC 1920
 AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAGATAC CAGGGTPTC CCGCTGGAAG 1980
 CTCCTCGTG CGCTCTCCTT AGGTATCTCA GTTCGGTCTA GGTCTTTCG TCCAAGCTGG 2040
 GCTCTGTGCA CGAACCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGGGC CTTATCGGT AACTATCGTC 2100
 TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CCGCACTGGC AGCAGCCACT GGTAAACAGGA 2160
 TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GCGGTGCTA CAGAGTCTT GAAAGTGTGG CCTAACTAGC 2220
 GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGA 2280
 AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTPTTTTGG 2340
 TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCTT TCGTCTTTT 2400
 CTACCGGGTC TCACCGCTCAG TCGAACGAAA ACTCGCTGTA AGGGATTTG GTCATGAGAT 2460
 TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTT TAAATTAAAA ATGAAGTTT AAATCAATCT 2520
 AAACATATA TTAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCAGGTA 2580
 TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTCCCTG ACTCCCGTC GGTAGATAA 2640
 CTACGATAG GAGGGSCTTA CCATCTGSCC CCAGTCCCGC AATGATACCG CGAGACCCAC 2700
 GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGCC GAGCCGAGAA 2760
 GTGGTCCCTG AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTA TTGTTGCCCG GAAGCTAGAG 2820
 TAAGTAGTTC GGCAGTTAAT AGTTGGGCA ACGTTGTTGC CACTCTGCA GGCATCGTGG 2880
 TGTCCGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TCCCAACGA TCAAGCCGAG 2940
 TTACATGATC CCCCAGTTG TCGRAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCGGTCTT CCGATCGTTC 3000
 TCACRAGTAA GTTGGCCGCA GGTITATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATRAATCTC 3060
 TFACTGTGAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT 3120
 TCTGAGATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTTCCCG GCGTCAACA CGGGATAATA 3180
 CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGC AAAACGTTCT TCGGGCCGAA 3240
 AACTCTCAAG GATCTTACC GGTGTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTCCACCCA 3300
 ACTGATCTTC AGCATCTTT ACTTTCACCA GCCTTTCTGG GPGAGCAAAA ACAGGAAGGC 3360
 AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGCCA CACGGAAATG TTGAATCTC ATACTCTTCC 3420
 TPTTCAATA TTATTTAAGC ATTTATCAGG GTTATGTCT GATCAGCCGA TACATATTTG 3480

ES 2 345 580 T3

AATGTATTTA GAAAATAAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTCCCCCGA AAAGTGCCAC 3540
CTGACGCTCA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAAACCTA TAAAAATAGG CGTATCACGA 3600
5 GGCCCTTTTCG TCTTCAAG 3618

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:73:

- 10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 42 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
15 (C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA
20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:73:

GGACTGTGTC CCTGTGTGAT GCTTTTGATG TCTGGGGCCA AG 42

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:74:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 42 pares de bases
30 (B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:74:

40 CACCAAGTTG AGCTGCCTGG TCACAGAGCT GACCACGTAT GA 42

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:75:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 42 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
50 (C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA
55 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:75:

TGGTATTACT ATGGTTCGGG GAGTTATTAT AACCACAGTG TC 42

60 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:76:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 42 pares de bases
65 (B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla

ES 2 345 580 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:76:

CAGCAGGTGC ACACCCAATG GCCATGAGCC CAGACACTGG AC 42

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:77:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

15 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:77:

25 TGAGCCCAGA CACTGGAC 18

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:78:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 45 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:78:

40 GTTAAAGAGG ATTTATTCA CCCCTGTGTC CTCTCCACAG GTGTC 45

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:79:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 812 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

50 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

55 (ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: join(241..286, 373..677)

60 (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "Gen de la familia V-HI humana V-H49.8"

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:79:

65

ES 2 345 580 T3

	TTCCTCAGGC AGGATTTAGG GCTTGGTCTC TCAGCATCCC ACACTTGTAC AGCTGATGTG	60
5	GCATCTGTGT TTTCTTCTC ATCCTAGATC AAGCTTTGAG CTGTGAAATA CCTCGCCTCA	120
	TGAATATGCA AATAATCTGA GGTCTTCTGA GATAAATATA GATAATATTG TGCCCTGAGA	180
	GCATCACATA ACAACCAGAT TCCTCCTCTA AAGAGCCCC TGGGAGCACA GCTCATCACC	240
10	ATG GAC TGG ACC TGG AGG TTC CTC FTT GTG GTG GCA GCA GCT ACA G	288
	Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr	
	1 5 10 15	
15	GTAAGGGGCT TCCTAGTCCT AAGGCTGAGG AAGGGATCCT GGTTTAGTTA AAGAGCATT	346
	TRTTACCCCC TGTGTCTCTT CCACAG GT GTC CAG TCC CAG GTC CAG CTG GTG	398
20	Gly Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val	
	20	
	CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG AAG GTC TCC	446
25	Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser	
	25 30 35 40	
	TGC AAG GCT TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT GCT ATC AGC TGG GTG	494
30	Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val	
	45 50 55	
	CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA AGG ATC ATC CCT	542
35	Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Ile Pro	
	60 65 70	
	AFC CTT GGT ATA GCA AAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GCC AGA GTC ACG	590
40	Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr	
	75 80 85	
	ATT ACC GCG GAC AAA TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC	638
45	Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser	
	90 95 100	
	CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GACACAGTGT	687
50	Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg	
	105 110 115	
	GAAAACCCAC ATCCTGAGAG TGTCAGAAAC CCTGAGGGAG AAGGCAGCTG TGCCGGGCIG	747
55	AGGAGATGAC AGGGTTTATT AGGTTTAAGS CTGTTTACAA AATGGSTTAT ATATTTGAGA	807
	AAAAA	812

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:80:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 117 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:80:

ES 2 345 580 T3

	Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Arg	Phe	Leu	Phe	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly
	1				5					10					15	
5	Val	Gln	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
				20					25					30		
10	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe
			35					40					45			
15	Ser	Ser	Tyr	Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
		50					55					60				
20	Glu	Trp	Met	Gly	Arg	Ile	Ile	Pro	Ile	Leu	Gly	Ile	Ala	Asn	Tyr	Ala
	65					70					75					80
25	Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser
				85						90					95	
30	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
				100					105					110		
35	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg											
			115													

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:81:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 12 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:81:
- CCGGTCGACC GG 12

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:82:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 40 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:82:
- CTAGCTCGAG TCCAAGGAGT CTGTGCCGAG GTGCAGCTGN 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:83:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 40 pares de bases

ES 2 345 580 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:83:

10

GTTGCTCGAG TGAAAGGTGT CCAGTGTGAG GTGCAGCTGN 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:84:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

20

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:84:

25

GGCGCTCGAG TTCCACGACA CCGTCACCGG TTC 33

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:85:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

35

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

40

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:85:

CCTGCTCGAG GCAGCCAACG GCCACGCTGC TCG 33

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:86:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 88 pares de bases

50

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

55

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:86:

TACTGTGCGA GACGGCTAAA CTGGGTTGA TGCTTTTGAT ATCTGGGGCC AAGGGACAAT 60

60

GGTCACCGTC TCTTCAGCCT CCACCAAG 88

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:87:

65

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 87 pares de bases

ES 2 345 580 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:87:

10

TACTGTGCGA GACACCGTAT AGCAGCAGCT GGCTTTGACT ACTGGGGCCA GGGAAACCCTG 60

GTCACCGTCT CCTCAGCCTC CACCAAG 87

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:88:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 87 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

25

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:88:

TACTGTGCGA GATATTACTA CTACTACTAC GGTATGGACG TCTGGGGCCA AGGGACCACG 60

GTCACCGTCT CCTCAGCCTC CACCAAG 87

30

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:89:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

35

(A) LONGITUD: 104 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

40

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:89:

45

TACTGTGCGA GACATTACGA TATTTTGACT GGTOCTACTA CTACTACGGT ATGGACGTCT 60

GGGGCCAAGG GACCACGGTC ACCGTCTCCT CAGCCTCCAC CAAG 104

50

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:90:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 101 pares de bases

55

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

60

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:90:

TACTGTGCGA GACGGAGGTA CTATGGTTCG GGGACTTATT ATAACCTCTT TGACTACTGG 60

65

GGCCAGGGAA CCTGGTCACC GTCTCCTCAG CCTCCACCAA G 101

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:91:

ES 2 345 580 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 84 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:91:

TACTGTGCGA GACGGGGGGT GTCTGATGCT TTTGATATCT GGGGCCAAGG GACAATGGTC 60

ACCGTCTCTT CAGCCTCCAC CAAG 84

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:92:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:92:

TACTGTGCGA GAGCAACTGG CGCTTTTGAT ATCTGGGGCC AAGGGACAAT GGTCACCGTC 60

TCTTCAGGGA GTGCATCC 78

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:93:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 99 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:93:

TACTGTGCGA GATCGGCTAA CTGGGGATCC TACTACTACT ACGGTATGGA CGTCTGGGGC 60

CAAGGGACCA CGGTCACCGT CTCCTCAGGG AGTGCATCC 99

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:94:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 69 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:94:

ES 2 345 580 T3

TACTGTGCGA GATACTTCCA GCACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTCACCCT CTCCTCAGGG 60
AGTGCCTCC 69

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:95:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 81 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:95:

20 TACTGTGCGA GACACGTAGC TAACTCTTTT GACTACTGGG GCCAGGGAAC CCTGGTCACC 60
GTCTCCTCAG GGAGTGCATC C 81

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:96:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 93 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
30 (C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:96:

TACTGTGCGA GACAAATTAC TATGGTTCGG GGAGTCCCT TTGACTACTG GGGCCAGGGA 60
ACCCTGGTCA CCGTCTCCTC AGGGAGTGCA TCC 93

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:97:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 72 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:97:

55 TACTGTGCGA GACAATACTT CCAGCACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTCAC CGTCTCCTCA 60
GGGAGTGCAT CC 72

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:98:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 93 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
65 (C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 345 580 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:98:

5 TACTGTGCGA GACAACTGG GGACTACTAC TACTACGGTA TGGACGTCTG GGGCCAAGGG 60
ACCACGGTCA CCGTCTCCTC AGGGAGTGCA TCC 93

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:99:

10

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 107 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

20

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:99:

TACTGTGCGA GACATTACTA TGGTTCGGGG AGTTATGACT ACTACTACTA CGGTATGGAC 60
GTCTGGGGCC AAGGGACCAG GTCACCGTCT CCTCAGGGAG TGCATCC 107

25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:100:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

30

(A) LONGITUD: 64 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

35

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:100:

40 TACTGTGCGA GACAGGGAGT GGGGCCAGGG AACCTGGTC ACCGTCTCCT CAGCCTCCAC 60
CAAG 64

45

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:101:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 80 pares de bases

50

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

55

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:101:

60 TACTGTGCGA GATTCTGGGA GACTGGTTCG ACCCTGGGG CCAGGGAACC CTGGTCACCG 60
TCTCCTCAGG GAGTGCATCC 80

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:102:

65

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 102 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 345 580 T3

- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:102:

TACTGTGCGA GACGGAGGTA CTATGGTTCG GGGAGTTAT ATAACGTCTT TGACTACTGG 60

GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCCTCA GCCTCCACCA AG 102

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:103:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 78 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:103:

TACTGTGCGA GACAAACCTG GGGAGGAGAC TACTGGGGCC AGGGAACCCT GGTACCCGTC 60

TCCTCAGCCT CCACCAAG 78

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:104:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 99 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:104:

TACTGTGCGA GAGGATATAG TGGCTACGAT AACIACTACT ACGGTATGGA CGTCTGGGSC 60

CAAGGGACCA CGGTACCCGT CTCTCAGCC TCCACCAAG 99

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:105:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 84 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:105:

TACTGTGCGA GACAAACTGG GGAGGACTAC TTTGACTACT GGGGCCAGGG AACCCCTGGTC 60

ACCGTCTCCT CAGGGAGTGC ATCC 84

ES 2 345 580 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:106:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 94 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:106:

TACTGRGCGA GATATAGTGG CTACGATTAC CTACTGGTAC TTCGATCTCT GGGGCCGTGG 60

CACCCCTGGTC ACCGTCTCCT CAGCCTCCAC CAAG 94

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:107:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 96 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:107:

TACTGRGCGA GAGCATCCCT CCCCTCCTTT GACTACTACG GTATGGACGT CTGGGGCCAA 60

GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGCCTCC ACCAAG 96

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:108:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 76 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:108:

TACTGTGCGA GACGGGGTGG GGTTTGACTA CTGGGGCCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC 60

CTCAGGGAGT GCATCC 76

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:109:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 94 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:109:

ES 2 345 580 T3

TACTGTGTGC CGGTCGAAAC TTTACTACTA CTACTACGGT ATGGACGTCT GGGGCCAAGG 60
GACCACGGTC ACCGTCTCCT CAGGGAGTGC ATCC 94

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:110:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 84 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:110:

20 TACTGTGCGA GAGATATTTT GACTGGTTAA CGTGACTACT GGGGCCAGGG AACCTGCTC 60
ACCGTCTCCT CAGGGAGTGC ATCC 84

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:111:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 93 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
30 (C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:111:

TACTGTGCGA GACATGGTAT AGCAGCAGCT GGTACTGCTT TTGATATCTG GGGCCAAGGG 60
ACAATGGTCA CCGTCTCTTC AGGGAGTGCA TCC 93

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:112:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 84 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:112:

55 TACTGTGTGA GATCAACTGG GGTGATGCT TTTGATATCT GGGGCCAAGG GACAATGGTC 60

ACCGTCTCTT CAGGGAGTGC ATCC 84

60 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:113:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 65 (A) LONGITUD: 85 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 345 580 T3

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:113:

TACTGTGCGG AAATAGCAGC AGCTGCCCTA CTTTACTACT TGGGGCCAGG GAACCTGGT 60

CACCGTCTCC TCAGGGAGTG CATCC 85

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:114:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 87 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:114:

TACTGTGTGT GTATAGCAGC AGCTGGTAAA GGAAACGGCT ACTGGGGCCA GGAACCCCTG 60

GTCACCGTCT CCTCAGGGAG TGCATCC 87

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:115:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 75 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:115:

TACTGTGCGA GACAAAAGTG GGTGACTACT TGGGGCCAGG GAACCTGGT CACCGTCTCC 60

TCAGGGAGTG CATCC 75

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:116:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:116:

Tyr Cys Ala Arg Arg Leu Thr Gly Val Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
1 5 10 15

Gln Gly Thr Met Val Thr Met Ser Ser Ala Ser Thr Lys
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:117:

ES 2 345 580 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:117:

Tyr Cys Ala Arg His Arg Ile Ala Ala Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:118:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:118:

Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
1 5 10 15

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:119:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 34 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:119:

Tyr Cys Ala Arg His Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Pro Thr Thr Thr Thr
1 5 10 15

Val Trp Thr Ser Gly Ala Lys Gly Pro Arg Ser Pro Ser Pro Gln Pro
20 25 30

Pro Pro

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:120:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 34 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

ES 2 345 580 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:120:

5 Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Val
1 5 10 15
10 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Asp
20 25 30
Thr Lys

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:121:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 aminoácidos

20 (B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:121:

30 Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Val Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
1 5 10 15
35 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Asp Thr Lys
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:122:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

45 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:122:

50 Tyr Cys Ala Arg Ala Thr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
1 5 10 15
55 Met Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:123:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

65 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

ES 2 345 580 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:123:

5 Tyr Cys Ala Arg Ser Ala Asn Trp Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
1 5 10 15
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala
20 25 30
10 Ser

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:124:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 23 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CADENA:
20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:124:

25 Tyr Cys Ala Arg Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
1 5 10 15
30 Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser
20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:125:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 27 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CADENA:
45 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:125:

50 Tyr Cys Ala Arg His Val Ala Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
1 5 10 15
55 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:126:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 60 (A) LONGITUD: 31 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CADENA:
65 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

ES 2 345 580 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:126:

5 Tyr Cys Ala Arg Gln Ile Thr Met Val Arg Gly Val Pro Phe Asp Tyr
1 5 10 15
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser
20 25 30

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:127:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 24 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:127:

25 Tyr Cys Ala Arg Gln Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
1 5 10 15
30 Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser
20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:128:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 31 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
40 (C) CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:128:

50 Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser
20 25 30

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:129:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 36 aminoácidos
60 (B) TIPO: aminoácido
(C) CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:129:

ES 2 345 580 T3

Tyr Cys Ala Arg His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15

5 Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
20 25 30

Gly Ser Ala Ser
35

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:130:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 21 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:130:

25 Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Val Gly Pro Gly Asn Pro Gly His Arg Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu His Gln
20

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:131:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

35 (A) LONGITUD: 26 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:131:

45 Tyr Cys Val Arg Phe Trp Glu Thr Gly Ser Thr Pro Gly Ala Arg Glu
1 5 10 15

Pro Trp Ser Pro Ser Pro Gln Gly Val His
20 25

50 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:132:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 34 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

60 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:132:

65

ES 2 345 580 T3

Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Val
1 5 10 15

5 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser
20 25 30

Thr Lys

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:133:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 aminoácidos

15 (B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:133:

25 Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Trp Gly Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Lys
20 25

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:134:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 aminoácidos

35 (B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:134:

45 Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Asn Tyr Tyr Tyr Gly Ile
1 5 10 15

His Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr
20 25 30

50 Lys

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:135:

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

60 (C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:135:

ES 2 345 580 T3

Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Gly Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
1 5 10 15
5 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:136:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

15 (C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:136:

Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Gly Tyr Asp Tyr Leu Leu Val Leu Arg Ser
1 5 10 15
25 Leu Gly Pro Trp His Pro Gly His Cys Leu Leu Ser Leu His Arg
20 25 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:137:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

35 (C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:137:

Tyr Cys Ala Arg Ala Ser Leu Pro Ser Phe Asp Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15
45 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Lys
20 25 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:138:

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

55 (C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:138:

Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Gly Gly Leu Thr Thr Gly Ala Arg Glu Pro
1 5 10 15
65 Trp Ser Pro Ser Pro Gln Gly Val His
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:139:

ES 2 345 580 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:139:

Tyr Cys Val Pro Val Glu Thr Leu Leu Leu Leu Arg Tyr Gly Arg
1 5 10 15

Leu Gly Pro Arg Asp His Gly His Arg Leu Leu Arg Glu Cys Ile
20 25 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:140:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:140:

Tyr Cys Val Arg Asp Ile Leu Thr Gly Glx Arg Asp Tyr Trp Gly Gln
1 5 10 15

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:141:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:141:

Tyr Cys Ala Arg His Gly Ile Ala Ala Ala Gly Thr Ala Phe Asp Ile
1 5 10 15

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser
20 25 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:142:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

ES 2 345 580 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:142:

5 Tyr Cys Val Arg Ser Thr Gly Val Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
1 5 10 15
5 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:143:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

15 (C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:143:

25 Tyr Cys Ala Glu Ile Ala Ala Ala Ala Leu Leu Leu Glx Leu Leu Gly
1 5 10 15
25 Pro Gly Asn Pro Gly His Arg Leu Leu Arg Glu Cys Ile
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:144:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

35 (C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:144:

45 Tyr Cys Val Cys Ile Ala Ala Ala Gly Lys Gly Asn Gly Tyr Trp Gly
1 5 10 15
45 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:145:

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

55 (C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:145:

65 Tyr Cys Ala Arg Gln Asn Trp Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
1 5 10 15
65 Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:146:

ES 2 345 580 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 42 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:146:

TCAGTGAAGG TTTCTGCAA GGCATCTGGA TACACCTTCA CC 42

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:147:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 42 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:147:

TCCCTGAGAC TGTCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA GT 42

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:148:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 45 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:148:

GGCCGCATCC CGGGTCTCGA GGTGACAAG CTTTCGAGGA TCCGC 45

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:149:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 45 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:149:

GGCCGCGGAT CCTCGAAAGC TTGTGACCT CGAGACCCGG GATGC 45

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:150:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 39 pares de bases

ES 2 345 580 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:150:

10

GGCCGCTGTC GACAAGCTTA TCGATGGATC CTCGAGTGC 39

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:151:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

20

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:151:

25

GGCCGCACTC GAGGATCCAT CGATAAGCTT GTCGACAGC 39

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:152:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

35

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

40

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:152:

CACCTTCGGC CAAGGGACAC GACTGGAGAT TAAACGTAAG CA 42

45

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:153:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 48 pares de bases

50

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

55

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:153:

AGGTTCACTG GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCAGTCTCA CCATCAGC 48

60

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:154:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

65

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

ES 2 345 580 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:154:

GATCCTCGAG ACCAGGTACC AGATCTTGTG AATTCC 36

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:155:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:155:

TCGACGAATT CACAAGATCT GGTACCTGGT CTCGAG 36

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:156:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:156:

CGCGGTACCG AGAGTCAGTC CTCCCAAAT GTC 33

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:157:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:157:

CGCCTCGAGA CAGCTGGAAT GGGCACATGC AGA 33

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:158:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

ES 2 345 580 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:158:

CGCGGTACCG CTGATGCTGC ACCAACTGTA TCC 33

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:159:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:159:

CGCCTCGAGC TAACACTCAT TCCTGTTGAA GCT 33

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:160:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:160:

35 **GGCGCTCGAG CTGGACAGGG MTCGAKAGTT CCA 33**

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:161:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

45 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:161:

CCCACTCTG CATGCTGCAG AAGCTTTTCT GTA 33

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:162:

55

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

60 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:162:

ES 2 345 580 T3

GGTGACTGAG GTACCTTGAC CCCAGTAGTC CAG 33

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:163:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:163:

20 GGTTACCTCA GTCACCGTCT CCTCAGAGGT AAGAATGGCC TC 42

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:164:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:164:

35

AGGCTCCACC AGACCTCTCT AGACAGCAAC TAC 33

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:165:

40

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 51 pares de bases

45 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:165:

TGGGGTCAAG GAACCTCAGT CACCGTCTCC TCAGGTAAGA ATGGCCTCTC C 51

55

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:166:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

60 (A) LONGITUD: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

65 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:166:

ES 2 345 580 T3

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:167:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 53 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:167:

TGGGGTCAAG GTACCTCAGT CACCGTCTCC TCAGAGGTAA GAATGGCCTC TCC 53

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:168:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:168:

35 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:169:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

45 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:169:

CTGGTCTCA GAGAGTCAGT CCTTCCAAA TGTCTTCCC CTCGTC 46

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:170:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

60 (B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:170:

ES 2 345 580 T3

Glu Ser Gln Ser Phe Pro Asn Val Phe Pro Leu Val
1 5 10

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:171:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:171:

CTGGTCCTCA GAGTCAGTCC TTCCCGAATG TCTTCCCCT CGTC 44

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:172:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:172:

35 Ser Gln Ser Phe Pro Asn Val Phe Pro Leu Val
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:173:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

45 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:173:

TAGAAGGAAT TCAGCAGGCA CACAACAGAG GCAGTTCCA 39

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:174:

55

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 38 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

60 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:174:

65

ES 2 345 580 T3

AGCTTCTCGA GCTCCTGCTG CTCTGTTTCC CAGGTGCC 38

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:175:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:175:

CAGCTTCTCG AGCTCCTGCT ACTCTGGGCTC MCAGATACC 39

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:176:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

25 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:176:

TATTACTGTG CGAGGGCTCC AACTGGGGAC TGGTTCGAC 39

35

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:177:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 13 aminoácidos

40 (B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

45 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:177:

50

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Thr Gly Asp Trp Phe Asp
1 5 10

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:178:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

60 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:178:

ES 2 345 580 T3

TATAATAGTT ACCCTCCTAG TTTGGGC 27

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:179:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

10

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:179:

Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly
1 5

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:180:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

25

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:180:

35

GGCGCGCCTT GGCCTAAGAG GCCA 24

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:181:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

40

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:181:

50

CCTCTTAGGC CAAGGCGCGC CTGG 24

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:182:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

55

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

60

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:182:

65

AATTCAGTAT CGATGTGGTA C 21

ES 2 345 580 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:183:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 13 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:183:

GAGATCGATA CTG 13

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:184:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:184:

GTTTGCAGGT GTCCAGTGTS AGGTGCAGCT GKTGGAGTCY SG 42

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:185:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:185:

CCGGTCGACC CG 12

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:186:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:186:

TCACAAGCCG AGCAACACCA AG 22

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:187:

ES 2 345 580 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:187:

AAAAGCCAGA AGACCCCTCTC CCTG 24

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:188:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:188:

CAATAGGGGT CATGGACCC 19

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:189:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:189:

TCATTCTGTG CAGAGTTGGC 20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:190:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:190:

GTCCAGAATT CCGTBCAGCT GGTGSAGTCT GG 32

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:191:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

ES 2 345 580 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:191:

10

GGTTTCTCGA GGAAGAGGAA GACTGACGGT CC

32

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:192:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

20

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:192:

25

GACATCCAGC TGACCCAGTC TCC

23

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:193:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

35

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:193:

40

GATATTCAGC TGA CTCAGTC TCC

23

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:194:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

50

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

55

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:194:

60

GAAATTCAGC TGACGCAGTC TCC

23

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:195:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

65

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 345 580 T3

- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:195:

GAAACGCAGC TGACGCAGTC TCC 23

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:196:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 35 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:196:

GCAAGCTTCT GTCCCAGACC CACTGCCACT GAACC 35

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:197:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:197:

CGGTAAACAT AGCCCTGGGA CGAGAC 26

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:198:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:198:

GGGTAAACTC ATTGCCTCCA AAGCAC 26

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:199:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 413 pares de bases

ES 2 345 580 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:199:

```
10      TGCACAAGAA CATGAAACAC CTGTGGTTCT TCCTCCTCCT GGTGGCAGCT CCCAGATGGG      60
      TCCTGTCCCA GGTGCAGCTT CATCAGTGGG GCGCAGGACT GTGGAAGCCT TCGGAGACCC      120
15      TGTCOCTCAC CTGCGCTGTC TATGGTGGGT CCTTCAGTGG TTACTTCTGG AGCTGGATCC      180
      GCCACCCCCC AGGGAGGGGG CTGGAGTGGG TTGGGAAAT CCATCATCGT GGAAGCACCA      240
20      ACTACAACCC GTCCTTCGAG AGTCGAGTCA CCCTATCAGT AGACACGTCC AAAAAACAGT      300
      TCTCCTGAG GCTGAGTTCT GTGACCGCGG CGGACACGGC TGIGTATTAC TGTGGAGAG      360

25      ACATTACTAT GGTTCGGGGA GTACCTCACT GGGGCCAGGG AACCTGCTC ACC      413
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:200:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 153 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

35

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

40

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:200:

```
45      GACAGACTTC ACTCTCACCA TCAGCAGACT GGAGCCTGAA GATTTTGCAG TGTATTACTG      60
      TCAGCAGTAT GGTAGCTCAC CCTCACTTT CGGCGGAGGG ACCAAGGTGG AGATCAAACG      120
      AACTGTGGCG GCACCATCTG TCTTCATCTT CCC      153
```

50

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:201:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 414 pares de bases

55

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

60

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:201:

65

ES 2 345 580 T3

	TCCACCATCA TGGGGTCAAC CGCCATCCTC GCGCTCCTCC TGGCTGTTC CCAAGGAGTC	60
5	TGTGCCGAGG TGCAGCTGGT GCAGTCTGGA GCAGAGGIGA AAAAGCCCGG GGAGTCTCTG	120
	AAGATCTCCT GTAAGGGTTC TGGATACAGC TTTACCAGTT ACTGGATCGC CTGGGTGCGC	180
	CAGATGCCCG GGAAGGCGT GGAGTGGATG GGGATCATCG ATCCTGCTGA CTCTGATACC	240
10	AGATACAACC CGTCCTTCCA AGGCCAGGTC ACCATCTCAG CCGACAAGTC CAPCAGTACC	300
	GCCTATTTC AGTGGAGCAG CCTGAAGGCC TCGGACACCG CCATGTATTA CTGTGGGAGA	360
15	CCAGCGAACT GGAAGTGGTA CTTCGTCTC TGGGGCCGTG GCACCCTGGT CACT	414

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:202:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 156 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

25 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:202:

GACAGATTTC ACTCTCACCA TCAGCAGCCT GCAGCCTGAA GATTTTGCAA CTTATTACTG 60

35 TCAACAGTTT ATTAGTTACC CTCAGCTCAC TTTCCGGCGA GGGACCAAGG TGGAGATCAA 120

ACGAACTGTG GCTGCACCAT CTGTCTTCAT CTTCCC 156

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:203:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 404 pares de bases

45 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:203:

TGCACAAGAA CATGAAACAC CTGTGGTTCT TCCTCCTCCT GGTGGCAGCT CCCAGATGGG 60

55 TCCTGTCCCA GGTGCAGCTA CAGCAGTGGG GCGCAGGACT GTTGAAGCCT TCGGAGACCC 120

TGTCCCTCAC CTGCGCTGTC TATGGTGGGT CCTTCAGTGG TFACTACTGG AGCTGGATCC 180

60 GCCAGCCCCC AGGTAAGGGG CTGGAGTGGG TTGGGGAAAT CAATCATAGT GGAAGCACCA 240

ACTACAACCC GTCCCTCAAG AGTCGAGTCA CCTATTCAGT CGACACCTCC AAGAACCAGT 300

65 TCTCCCTGAA ACTGAGCTCT GTGACCGCCG CGGACACGGC TGTGTATTAC TGTGCGAGAG 360

TAATTAATIG GTTCGACCCC TGGGGCCAGG GAACCCTGGT CACC 404

ES 2 345 580 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:204:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 153 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:204:

```
GACAGATTTG ACTCTCACCA TCAGCAGCCT GCAGCCTGAA GATTTTGCAA CTTACTATTG      60
TCAACAGGCT AATAGTTTCC CSTACACTTT TGGCCAGGGG ACCAAGCTGG AGATCAAACG      120
AACTGTGGCT GCACCATCTG TCTTCATCTT CCC                                     153
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:205:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 403 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:205:

```
ATGAACACC TGTGGTTCTT CCTCCTCCTG GTGGCAGCTC CCAGATGGGT CCTGTCCAG      60
GTGCAGCTAC AGCAGTGGGG CGCAGGACTG TTGAAGCCTT CGGAGACCTT GTCCCTCACC      120
TGGCCTGTCT ATGGTGGGTC CTFCAGTGGT TACTACTGGA GCTGGATCCG CCAGCCCCCA      180
GGTAAGGGGC TGGAGTGGAT TGGGGAAATC AATCATAGTG GAAGCACCAA CTACAACCCG      240
TCCCTCAAGA STCGAGTCAC CATATCAGTC GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCCTGAAG      300
CTGAGCTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCT GTGTATTACT GTGCGAGAGT AATTAATGG      360
TTGACCCCT GGGGCCAGGG AACCTGGTC ACCGTCTCCT CAG                                     403
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:206:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 388 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:206:

ES 2 345 580 T3

	ATGGACATGA TGGTCCCCGC TCAGTCTCTG GGGCTCCTGC TSCCTCTGTT CCCAGGTTCC	60
5	AGATGCGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCTTCCGTGT CTCCATCTGT AGCAGACAGA	120
	GTCACCATCA CTTGTGGGGC GAGTCAGGAT ATTAGCAGCT GGTTAGCCTG GTATCAGCAT	180
	AAACCAGGGA AAGCCCTAA GCTCCTGATC TATGCTGCAT CCAGTTTGCA AAGTGGGGTC	240
10	CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGCAGCCTE	300
	CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTA CTATTGT CAACAGGCTA ATAGTTTCCC GTACACTTTT	360
15	GGCCAGGGGA CCAAGCTGGA GATCAAAC	388

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:207:

	(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 462 pares de bases	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
25	(C) CADENA: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA	
30	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:207:	
	ATGGGGTCAA CCGCCATCCT CGCCCTCCTC CTGGCTGTTT TCCAAGCAGT CTGTGCCGAG	60
	GTGCAGCTGG TGCAGTCTGG AGCAGAGGTG AAAAAGCCCG GGGAGTCTCT GAAGATCTCC	120
35	TGTAAGGGTT CTGGATACAG CTTTACCGGC TACTGGATCG GCTGGGIGCG CCAGATGCCC	180
	GGGAAAGGCC TGGAGTGGAT GGGGATCATC TATCCTGGTG ACTCTGATAC CACATACAGC	240
40	CGTCTCTCC AAGGCCAGGT CACCATCTCA GCCGACAAGT CCATCAGCAC CGCCTACCTG	300
	CAGTGGAGCA GCCTGAAGGC CTCGGACACC GCCATGTATT ACTGTGCGAG AGACCAACTG	360
45	GGCCTCTTTG ACTACTGGGG CCAGGGAAAC CTGGTCACCG TCTCCTCAGC CTCCACCAAG	420
	GGCCCATCGG TCTTCCCTCT GGCACCCTCC TCCAAGAAGC TT	462

50 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:208:

	(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 439 pares de bases	
55	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) CADENA: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
60	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:208:	

65

ES 2 345 580 T3

ATGGACATGG AGTTCCCCGT TCAGCTCCTG GGGCTCCTGC TGCTCTGTTT CCCAGSTGCC 60
 AGATGTGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCACTGT CTGCATCTGT AGGAGACAGA 120
 5 GTCACCAICA CTTGTGCGGC GAGTCAGGGT ATTAGCAGCT GGTTAGCCTG GTATCAGCAG 180
 AAACCAGAGA AAGCCCTAA GTCCCTGATC TATTCTGCAT CCAGTTTGA AAGTGGGGTC 240
 10 CCATCZAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTICA CTCTCACCAT CAGCAGCCTG 300
 CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGC CAACAGTATG ATAGTTACCC GTACACTTTT 360
 15 GGCAGGGGA CCAAGCTGCA GATCAAACGA ACTGTGGCTG CACCATCTGT CTTCATCTTC 420
 CCGCCATCTG ATGAAGCTT 439

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:209:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 10 aminoácidos
- 25 (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:209:

Asp Ile Thr Met Val Arg Gly Val Pro His
 35 1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:210:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
- 40 (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA:
- 45 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:210:

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr
 50 1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:211:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 10 aminoácidos
- 60 (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:211:

65

ES 2 345 580 T3

Pro Ala Asn Trp Asn Trp Tyr Phe Val Leu
1 5 10

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:212:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

10 (B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:212:

20 Gln Gln Phe Ile Ser Tyr Pro Gln Leu Thr
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:213:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:213:

35 Val Ile Asn Trp Phe Asp Pro
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:214:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

45 (C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:214:

50 Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Tyr Thr
1 5

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:215:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:215:

ES 2 345 580 T3

Asp Gln Leu Gly Leu Phe Asp Tyr
1 5

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:216:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

10 (B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:216:

Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:217:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 3881 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:217:

35	TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGA CTGCTG CGCTCGGTCG TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA	60
	TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAA T CAGGGGATAA CGCAGGAAAG	120
	AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAAAGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG	180
40	TTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG CATCACAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG	240
	TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCTCGTG	300
45	CGCTCTCCTG TTCGACCCCT GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTCT CCTTCGGGA	360
	AGCGTGGCGC TTTCTCATAG CTCACGCTGT AGTATCTCA GTTCGGTGTG GTCGTTCCG	420
	TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTATCCGGT	480
50	AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT	540
	GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GCGGTGCTA CAGAGTTCTT SAAGTGGTGG	600
55	CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT	660
	ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCCGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT	720
	GGTTTETTTG TTTCGAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT	780
60	TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAAAGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG	840
	GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT TAAATTAAA ATGAAGTTTT	900
65	AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCACT	960

ES 2 345 580 T3

GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTAETT SGTTCATCCA TAGTGGCTG ACTCCCCGTC 1020
 GGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA CCACTCGGCC CCAGTGGTGC AATGATACCC 1080
 5 CGAGACCCAC GCTCACCAGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC 1140
 GAGGGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCTCCATCC AGTCIATTAA TTGTGGCCGG 1200
 10 GAASCIAGAG IAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTCCGCA ACGTTCGTTG CATTGCTACA 1260
 GGCATCGTGG ESTCAGGCTC GTGCTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA 1320
 TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCARAAAAG CGGTAGCTC CTTGGTCCCT 1380
 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCAZGGTTAT GCCAGCACTG 1440
 CATAATTCTC TTACTGGCAT GCCATCCGTA AATAGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA 1500
 20 ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGGGG CGACCGAGTT GCTCTTGGCC GCGTCAATA 1560
 CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCAFTGG AAAACGTTCT 1620
 TCGGGCGGAA AACTCTCAGG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT 1680
 CSEGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA 1740
 ACAGGARAGG AATATGCCGC AAAAAAGGGA ATARGGGCGA CACGGAAATC TTCATACTC 1800
 30 ATACTCTTCC TTTTTCAATA TTATTGAAGC AITTATCAGG GTPAITGTCT CATCAGCGGA 1860
 TACTATTTG AATGATTEA GAAAAATEAA CAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCGCA 1920
 35 AAAGTCCAC CTGACGCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTACCTA TAAAAATAGG 1980
 CGTATCAGGA GGCCTTTGG TCTCGCGGT TTCGGTATG ACGGTGAAA CCTCTGACAC 2040
 40 ATGAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAGCGG ATGCCGGGAG CAGPCAAGCC 2100
 CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG ESTTGGCGGG TGTCGGGGCT GGCTTAACTA TCGGGCATCA 2160
 GAGCAGATTG TACTGAGAGT GCACCATAIG CCGTGTGAAA TACCGCACAG ATGCGTAAGG 2220
 45 AGAAAATACC GCATCAGCGG CCATTCGCCA TTCAGGCTGC GCAACTGTTG GGAAGGGCGA 2280
 TCGGTCCGGG CCTCTTCCTT ATTACGCCAG CTGGCGAAAG GGGGATGTGC TSCAAGGCGA 2340
 50 TTAAGTTGG TAACGCCAGG GTTTTCCGAG TCACGACCTT GTAAAACGAC GGCAGTGCC 2400
 AAGCTAGCGG CCGCGGTCCA ACCACCAATC TCAAGCTTG GTACCCGGGA GCCTGTTATC 2460
 55 CCAGCACAGT CCTGGAGAG GCACAGGGGA AATAAAAGCG GACGGAGCTT TTCTTGACT 2520
 CAGCCGCTGC CTGGTCTCTT TCAGACCTGT TCTCAATCTT AACTCTGAG CCGGTCCGAT 2580
 GACCTGGCCB TTCTTTGCCA AAGCATTGA GTTACTGCA AGCTCAGAAA AGCATGCARA 2640
 60 GCGCTCAGAA TGGCTCAAA GAGCTCCGAC ARAACATTT AGAACTTTAT TAAGGAATAG 2700
 GGGGAGCTA GGAAGAACT CAAAACATCA AGATTTTAAA TACGCTTCTT GGTCTCCTTG 2760
 65 CTATAATTAT CTGGGATAAG CATGCTGTTT TCTGTCTGTC CCTAACATGC CCTGTGATTA 2820

ES 2 345 580 T3

	TCGCAACA ACACACCCAA GGGCAGAACT TTGTTACTTA AACACCAIAC TGTTCCTTC	2380
5	TTTCCTCAGG AACTGTGGCT GCACCATCTG TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT	2940
	TGAAATCTGG AACTGCCICT GTTGTGTGCC TGCTGAAIAA CTCTATCCC AGAGAGGCCA	3000
	AAGTACAGTG GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCAGGAG AGTGTACAG	3060
10	AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG AGCAAAGCAG	3120
	ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCCTGG AAGTCACCCA TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG	3180
15	TCACAAAGAG CTTCAACAGG GGAGAGTGT AGAGGGAGAA GTGCCCCAC CTGCTCCTCA	3240
	GTTCCAGCCT GACCCCTCC CAICCTTTGG CCTGTGACC TTTTCCACA GGGACCTAC	3300
20	CCCTATTGGG GTCCTCCAGC TCATCTTTCA CCTACCCCC CTCCTCCTCC TTGGCTTTAA	3360
	TTATGCTAAT GTTGGAGSAG AATGAATAAA TAAAGTGAAT CTTTGCACCT GTGTTTTCTC	3420
25	TCTTTCTCA ATTTAATAAT TATTATCTGT TGTTTACCAA CTACTCAAT TCTTTATAA	3480
	GGGACTAAAT ATGTACTCAT CCTAAGGGGC ATAACCATTT ATAAAAATCA TCCTTCCTTC	3540
30	TATTTTACCC TATCATCCTC TGCAAGACAG TCCTCCCTCA AACCCACAAG CCTTCTGTCC	3600
	TCACAGTCCC CTGGGCCATG GATCCTCACA TCCCAATCCG CGGCCGCAAT TCGTAATCAT	3660
	GGTCATAGCT GTTTCCTGIG TGAATTGTT ATCCGCTCAC AATTCCACAC AACATACGAG	3720
35	CGGAAGCAT AAGTGTAAA GCCTGGGGTG CCTAATGAGT GAGCTAACTC ACATTAATTG	3780
	CGTTGGGCTC ACTGCCCGCT TTCAGTCCG GAAACCTGTC GIGCCAGCTG CATTAAAGAA	3840
40	TCEGCCAAG CGCCGGGAGA GGCGGTTTC GTATTGGGCG C	3881

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:218:

- | | | |
|----|---|-----|
| 45 | (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA: | |
| | (A) LONGITUD: 4723 pares de bases | |
| | (B) TIPO: ácido nucleico | |
| | (C) CADENA: sencilla | |
| 50 | (D) TOPOLOGÍA: lineal | |
| | (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA | |
| | (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:218: | |
| 55 | GAACTCGAGC AGCTGAAGCT TTCTGGGGCA GGCCAGGCCT GACCTTGGCT TTGGGGCAGG | 60 |
| | GAGGGGGCTA AGGTGAGGCA GGTGGCGCCA GCCAGGTGCA CACCCAATGC CCATGAGCCC | 120 |
| 60 | AGACACTGGA CGCTGAACCT CGCGGACAGT TAAGAACCCA GGGGCCTCTG CGCCCTGGGC | 180 |
| | CCAGCTCTGT CUCACACCGC GGTCACATGG CACCACCTCT CTTGCAGCCT CCAUUAAGGG | 240 |
| | CCCATCGGTC TTCCCCTGG CACCCTCTC CAAGAGCACC TCTGGGGGCA CAGCGGCCCT | 300 |
| 65 | GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA ACCGGTGACG GTGTCGTGGA ACTCAGGGCG | 360 |

ES 2 345 580 T3

1 OCTGACCAGC GGGGTGCACA CCTTCCCGGC TGTCTAGAG TCCICAGGAC CCTACTCCCT 420
 2 CAGCAGCGTG GGGACCGTGC CCTCCAGCAG CTTEGGCACC CAGACCTACA TCTGCAACGT 480
 5 GAATCACAAAG CCCAGCAACA CCAGGTGGA CAAGAAAGTT GGTGAGAGGC CAGCACAGGG 540
 6 AGGGAGGGTG TCTGCTGAA GCGAGGCTCA GCGCTCCTSC CTGGACGGAT CCCCCTATG 600
 10 CAGCCCCAGT CCAGGGCAGC AAGGCAGGCC CCGTCTGCCT CTCCACCCGG AGGCCTCTGC 660
 11 CCECCCCACT CATECTCAGG GAGAGGGTCT TCTGCCITTT TCCCCAGGCT CTGGGCAGGC 720
 15 ACAGSCTAGG TGCCCCAAC CCAGGCCCTG CACACAAAGG EGCAGGTGCT GGGCTCAGAC 780
 16 CTGCCAAGAG CCATATCCGG GAGGACCCCG CCGCTGACCT AAGCCCCACC CAAAGGCCAA 840
 17 ACTCTCCACT CCCTCAGCTC GGACACCTTC TCTCTCCCA GATTCCAGTA ACTCCCAATC 900
 20 TTCTCTCTGC AGAGCCCAA TCTTGTGACA AACTCTACAC ATGCCACCG TGCCAGSTA 960
 21 AGCCAGCCCA GGCTCGCCC TCCAGCTCAA GCGGGACAG GTGCCCTAGA GTAGCCTGCA 1020
 25 TCCAGGGACA GGCCCCAGCC GGGTCTGAC AGTCCACCT CCACTCTCTC CTCAGCACCT 1080
 26 GAACTCCTGG GGGGACCGTC AGTCTTCCTC TTCCCCCAA AACCCAGGA CACCTCATG 1140
 30 ATCTCCCGGA CCGCTGAGST CACATGCGTG GTGGTGGAGG TGAGCCACGA AGACCCCTGAG 1200
 31 GTCAAGTTCA ACTGGTACGT GGACGGCGTG GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGGGG 1260
 32 GAGGAGCAGT ACAACAGCAC GTACCGTGTG GTGAGCGTCC TCACCGTCTT GCACGAGAC 1320
 35 TGGCTGAATG GCAGGGAGTA CAAGTCCAAG GTCTCCAACA AAGCCCTCCC AGCCCCATC 1380
 36 GAGAAACCA TCTCCAAGC CAAAGGTGGG ACUCCTGGGG TGGGAGGGCC ACATGGACAG 1440
 40 AGSCCGGCTC GGCCACCCCT CTGCCCTGAG AGTGACCGCT GTACCAACCT CTGTCCCTAC 1500
 41 AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGATG AGCTGACCAA 1560
 45 GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCGTGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCGTGGG 1620
 46 GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGSAGACAA CTACAAGAC AGCCCTCCCG TGCTGGACTC 1680
 47 CGACGGCTCC TTCTTCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGG 1740
 50 GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGTGCAATGA GGTCTTGAC AACCACTACA CGCAGAAGAG 1800
 48 CCTCTCCCTG TCTCCGGSTA AATGAGTGG CCGCCCGCA AGCCCCGCT CCCCAGGCTC 1860
 55 TCGCGGTGCG ACGAGGATGC TTGGCACGTA CCCCCTGTAC ATACTTCCCG GGCSCCAGC 1920
 49 ATGGAATAA AGCACCCAGC GCTGCCCTGG GCCCCGGA CACTGTGATG GTTCTTTCCA 1980
 60 CGSSTCAGSC CGAGCTGAG GCCTGAGTGG CATGAGGGAG GCAGAGCGGG TCCCACTSTC 2040
 51 CCCACACTGG CCCAGGCTGT GCAGGTGTGC CTGGCCCCC TAGGGTGGGG CTCAGCCAGG 2100
 52 GGCTGCCCTC GGCAGGCTG GGGATTGCG AGCSTGGCCC TCCCTCCAGC ABCACCTGCC 2160
 65 CTGGGCTGGG CCACGGSAAG CCTAGGAGC CCGTGGGAC AGACACACAG CCGCTGCCTC 2220

ES 2 345 580 T3

TGTAGGAGAC TGTCTGTTC TGTGAGCGCC CCTGTCTCC CGACCTCCAT GCCACTCGG 2280
 GGGCATGCCCT GCAGGTCSAC TCTAGAGGAT CCCCGGTTAC CGAGCTCGAA TTCATCGAAG 2340
 5 ATATCASATC TGCCGGTCTC CCTATAGTGA GTCGRATTAA TTTCGATAAG CCAGETTAAC 2400
 CTGCATTAAI GAATCGGCCA ACCCGCGGGG ACAGCGCGGT TCGGTATTEG GCGCTCTTCC 2460
 10 GCTTCTCTGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG GTCGTCGGC TGCGGGGAGC GGTATCAGCT 2520
 CACTCAAAGG CGGTAATACG GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG 2580
 15 TCAGCAAAAG GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTCCT GGCCTTTTTC 2640
 CATAGGCTCC GCCCCCTGA CSAGCATCAC AAAAACTGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA 2700
 AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGGG TTTCCCTCTG GAGGCTCCCT CGTCCGCTCT 2760
 20 CCTGTTCGGA CCCTGCGCT TACCGGATAC CTGTCGGCT TTCTCCCTTC GGGAAAGCGE 2820
 GCGCTTTCTC AATGCTCAGC CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGTCCAAG 2880
 25 CTGGGCTGTG TCCACGAACC CCCGTTCCG CCCGACCGCT CCGCCTTATC CGGTAACAT 2940
 CGTCTTGAAT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC CACTCGTAAC 3000
 30 AGCATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGCCGCT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC 3060
 TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT ATCTGGGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC 3120
 GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT 3180
 35 TTTGTTTGC AACCAGCAGT TACCGCCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGGAGA TCCTTTGATC 3240
 TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACCTAC GTTAAGGGAT TTTGGTCAAT 3300
 40 AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAATF AAAAAAGGAG TTTTAAATCA 3360
 ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA 3420
 45 CCTATCTCAG CGATCTGTCT ATTTGCTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCG CGTGTGTAG 3480
 ATAACTACGA TACGGGAGGG CTTACCATCT GCGCCGAGTG CTGCAATGAT ACCCGGAGAC 3540
 CCACCTCAC CCGCTCCAGA TTTATCCCA ATAAACCAGC CAGCCGGAGG GCGCGAGCGC 3600
 50 AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCTCC ATCCAGTCTA TTAATTGTTG CCGGGAAGCT 3660
 AGAGTAAGTA GTTCCCGAST TAATAGTTG CGCAACGTTG FTCCCATTCG TACAGGCATC 3720
 55 GTGCTGTGAC GCTCGTCTT TGGTATGGCT TCATTCAGCT CCGGTTCCCA ACCATCAAGG 3780
 CGAGTTACAT GATCCCCCAT GTTGTGCAA AAAAGCGTTA GCTCCTTCGG TCTTCCGATC 3840
 60 GCTGTGAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAI 3900
 TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCAACCAAG 3960
 TCAETCTGAG AATAGTGTAT GCGCGACCG AGTGGCTCTT GCCCGGCTC AATACGGGAT 4020
 65 AATACCGCGC CACATAGCAG AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAAAG TTCTTCGGGG 4080

ES 2 345 580 T3

CCAAAACTCT CAAGGATCTT ACCGCTCTTG AGATCCAGTE CGATGTAACC CACTCGTGCA 4140
 CCCAACTGAT CTTGAGCATC TTTFACITTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAACAGGA 4200
 5 AGGCAAAATG CCGCAAAA AA GGAATAAGG GCGACAGGA AATGTTGAAT ACTCATACTC 4260
 TTCCTTTTTC AATATTATTG AAGCATTAT CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA 4320
 10 TTTGAATGTA TTTAGAAAA TAAACAAATA GGGGTCCCGC GCACAITTCC CCGAAAAGTG 4380
 CCACCTGACG TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTA CCTATAAAA TAGGCATATC 4440
 15 ACGAGGCCCT TTCGTCTCGC GCGTTCCGGT GATGACGGTG AAAACCTCTG ACACATGCAG 4500
 CTCCCGGAGA CCGTCACAGC TTGTCTGTAA GCGGATGCCG GGAGCAGACA AGCCCGTCAG 4560
 GGCCCGTCAG CCGGTGTTGG CCGGTGTCGG GCCTGGCTA ACTATGCCGC ATCAGAGCAG 4620
 20 ATTGTACTGA GAGTGCACCA TATGGACATA TTGTCTTAG AACCGGCTA CAATTAATAC 4680
 AEAACCTTAT GTATCATACA CATACGATTT AGGTGACACT ATA 4723
 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:219:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 524 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:219:

40 AAGCTTGCCA CCATGAACA CCTGTGGTTC TTCCTCTCC TGGTGGCAGC TCCTAGATGG 60
 GTCTGTCTC AGGTGCAGCT ACAGCAGTGG GCGGCAGGAC TGTGAAGCC TTCGGAGACC 120
 45 CTGTCCCTCA CCTGCGCTGT CTATGGTGGT TCCTTCAGTG GTTACTACTG GAGCTCGATC 180
 CGCCAGCCAC CAGGTAAGGG TCTGGAGTGG ATTGGTGAAA TCAATCATAG TGGGAAGCACC 240
 50 AACTACAACC CGTCTCTCAA GAGTCGAGTC ACCATATCAG TAGACACGTC CAAGAACCAG 300
 TTCTCTCTGA AACTGAGCTC TGTGACCCTT GCGGACACGG CTGTGTATTA CTGTGCGAGA 360
 GTAATTAATT GGTTGACCC TTGGGGCCAG GGAACCCCTGG TCACCGTCTC CTCAGCCTCA 420
 55 ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCGGCA CCTCTCTCCA AGAGCACCTC TGGGGGCACA 480
 GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT CAAGGACTAC TTCCCCEAAC CGGT 524
 60

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:220:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 65 (A) LONGITUD: 420 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 345 580 T3

- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:220:

```
AAGCTTGCCA CCATGATGGT CCCAGCTCAG CTCCTCGGTC TCCTGCTGCT CTTGGTTCCCA    60
GGTTCCAGAT GCGACATCCA GATGACCCAG TCTCCATCTT CCGTGTCTGC ATCTGTAGGA    120
GACAGAGTCA CCATCACTTG TCGGGCGAGT CAGGATATTA GCAGCTGGTT AGCCTGGTAT    180
CAGCATAAAC CAGGTAAGC ACCTAAGCTC CTGATCTATG CTGCATCCAG TTTGCAAAGT    240
GGTGTCCCAT CAAGGTTTCTG CGGARGTGGG TCTGGGACAG ATTTCACTCT CACCATCAGC    300
AGCCTGCAGC CTGAAGATTT TGCAACTTAC TATGTCAAC AGGCTAATAG TTTCCCGTAC    360
ACTTTTGGTC AGGGAACCAA GCTGGAGATC AAACGAACTG TGGCTGCACC ATCTGTCTTC    420
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:221:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 44 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:221:

```
ATGGTCCCAG CTCAGCTCCT CCGTCTCCTG CTGCTCTGGT TCCC    44
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:222:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 44 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:222:

```
AGGTTCCAGA TGCGACATCC AGATGACCCA GTCTCCATGT TCCG    44
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:223:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 44 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

ES 2 345 580 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:223:

5 TGTCTGCATC TGTAGGAGAC AGAGTCACCA TCACTTGTCG GGCG 44

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:224:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:224:

20 AGTCAGGATA TTAGCAGCTG GTTAGCCTGG TATCAGCATA AACC 44

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:225:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:225:

35 40 AGGTAAAGCA CCTAAGCTCC TGATCTATGC TGCATCCAGT TTGC 44

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:226:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

50 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:226:

55 AGGAGCTTAG GTGCTTTACC TGGTTTATGC TGATACCAGG CTA 44

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:227:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

65 (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 345 580 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:227:

5 CCAGCTGCTA ATATCCTGAC TCGCCCGACA AGTGATGGTG ACTC 44

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:228:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:228:

 TGTCTCCTAC AGATGCAGAC ACGGAAGATG GAGACTGGGT CATC 44

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:229:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:229:

40 TGGATGTGCG ATCTGGAACC TGGGAACCAG AGCAGCAGGA GACC 44

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:230:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

50 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:230:

 GAGGAGCTGA GCTGGGACCA TCATGGTGGC AAGCTTAGAG TC 42

60 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:231:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

65 (A) LONGITUD: 28 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

ES 2 345 580 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:231:

GACTCTAAGC TTGCCACCAT GATGGTCC 28

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:232:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:232:

ACCTTGATGG GACACCACTT TGCAAAGTGG ATGCAGCATA GATC 44

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:233:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:233:

AAAGTGGTGT CCCATCAAGG TTCAGCCGAA GTGGATCTGG GACA 44

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:234:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:234:

GATTTCACTC TCACCATCAG CAGCCTGCAG CCTGAAGATT TTGC 44

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:235:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 345 580 T3

- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:235:

AACTTACTAT TGTCAACAGG CTAATAGTTT CCCGTACACT TTTG 44

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:236:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 44 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:236:

GTCAGGGAAC CAAGCTGGAG ATCAAACGAA CTGTGGCTGC ACCA 44

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:237:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:237:

TCTGTCTTCA TCTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGA 37

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:238:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:238:

GGGAAGATGA AGACAGATGG TGCAGCCACA GTTCGTTTGA 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:239:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 44 pares de bases

ES 2 345 580 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:239:

10

TCTCCAGCTT GGTTCCTGA CAAAAAGTGT ACGGGAAACT ATTA 44

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:240:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

25

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:240:

GCCTGTTGAC AATAGTAAGT TGCAAATCT TCAGGCTGCA GGCT 44

30

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:241:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

35

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

40

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:241:

45

GCTGATGGTG AGAGTGAAAT CTGTCCCAGA TCCACTTCGG CTGA 44

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:242:

50

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

55

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

60

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:242:

TCAACTGCTC ATCAGATGBC 20

65

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:243:

ES 2 345 580 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 3819 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:243:

```
TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGCTCGSTCG TTCGGCTCCG GCGAGCGGTA      60
TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTAA TCCACAGAAAT CAGGGGATAA GCGAGGAAAG     120
AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCCG GTTGCTGGCG     180
TTTTTCCATA GGCTCCGCC CCGTACGAG CATCACAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG     240
TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC CCGCTGGAG CTCCTCGTS      300
CGCTCTCCTG TTCGACCOCT GCGGCTTACC GGATACCTCT CCGCCTTICT CCTTCGGCA      360
AGCGTGGCGC TTTCTCATAG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTSTA GGTGGYTGGC     420
TCCAGCTGG GGTGTGTGCA CGAACCCGCC GTTCAGCCCG ACGGCTGGCG CTTATCCGGT     480
AACTATCGIC TTGAGTCCAA CCGGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT     540
GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGCTATGTA GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG     600
CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT     660
ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGSTAGCGGT     720
```

ES 2 345 580 T3

	GGTTTTTTTG TTIGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT	780
	TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACCGCTCAG TGGAAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG	840
5	GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT TAAATTAAAA ATGAAGTTTT	900
	AAATCAATCI AAAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCACT	960
10	GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTG CGTTCAATCA TAGTTGCGTG ACTCCCGGTC	1020
	GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCITA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG	1080
	CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAGGGGCC	1140
15	GAGCCGAGAA GTGGTCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATPAA TTGTTGCGGG	1200
	GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA ACGTGTGTC CATTGCTACA	1260
20	GGCATCGTGG TGTACCGGTC GTCGTTTSGT ATGCGCTTCAI TCAGCTCCGG TCCCAACCGA	1320
	TCAAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCGGTCCCT	1380
	CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTAT GGCAGCACTG	1440
25	CATAATTCTC TTAGTGTCAI GCCACCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA	1500
	ACCAAGTCAI TCTGAGAATA GGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAACA	1560
30	CGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATYGG AAAACGTYCT	1620
	TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTGAT GTAACCCACT	1680
	CGTGACCCA ACTGATCTIC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA	1740
35	ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAAATG TCGAATACTC	1800
	ATACTCTICC TTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA	1860
40	TCATATTTG AATGTATTTA CAAAAATAA CAATAGGGG TTCGGCCGAC ATTTCCCGGA	1920
	AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCAT ATTATCATGA CATTACCTA TAAAAATAGG	1980
	CSTATCACGA GGCCCTTTCG TCTCGCGGT TTCGGTGATG ACGGTGAAA OCTCTGACAC	2040
45	ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC	2100
	CGTCAGGCG CCTCAGCGGG TGTGGCGGG TCTCGGGCT GGTTAACCTA TGCGGCATCA	2160
50	SAGCAGATTG TACTGAGAGT GCACCATATG CGGTGTGAAA TACCGCACAG ATGCGTAAGG	2220
	AGAAAATACC GCATCAGGCG CCATTCCGCA TTCAGGCTGC GCAACTGTTG CGAAGGGCGA	2280
	TCGGTGCGGG CCTCTTCGCT ATTACGCGAG CTGGCGAAA GGGGATGTGC TGCAAGGCGA	2340
55	TTAAGTTGGG TAACGCCAGG GTTTTCCCAG TCACGACGTT GTAABACGAC GGCCAGTGCC	2400
	AAGCTAGCGG CCGCGGTCCA ACCACCAATC TCAAAGCTTG CCACCATGAT GGTCCAGCT	2460
60	CAGCTCCTCG GTCTCCTGCI GCTCTGGTTC CCAGGTTCCA GATGCGACAT CCAGATGACC	2520
	CAGTCTCCAT CTTCGGTGC TGCATCTGTA GGAGACAGAG TCACCATCAC TTGTGGGGCG	2580

65

ES 2 345 580 T3

	AGTCAGGATA TTAGCAGCTG GTTAGCCTGG TATCAGGATA AACCAGCTAA AGCACCTAAG	2640
5	CTCCTGATCT ATGCTGCATC CAGTTTGCAA AGTGGTGTCC CATCAAGGTT CAGCGGAAGT	2700
	GGATCTGGGA CAGATTTTCC TCTCACCATC AGCAGCCTGC AGCCTGAAGA TTTTGCAACT	2760
	TACTATTGTC AACAGGCTAA TAGTTTCCCG TACACETTTG GTCAGGGAAC CAAGCTGGAG	2820
10	ATCAAACGAA CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC GGCCATCTGA TGAGCAGTTG	2880
	AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCG AGAGGCCAAA	2940
15	GTACAGTGGG AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TGGGTAACT CCCAGGAGAG TGTCACAGAG	3000
	CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC	3060
	TACGAGAAAC ACAAAGTCTA CGCCTCCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCGTC	3120
20	ACAAAGAGCT TCAACAGGGG AGAGTGTTAG AGGGAGAAGT GCCCCACCT GCTCCTCAGT	3180
	TCCAGCCTGA CCCCCCCCA TCCTTTGGCC TCTGACCTT TTCCACAGG GGACCTACCC	3240
25	CTATTGCGGT CCFCCAGETC ACFTTTACC TCACCCCCCT CCTCCCTCCTT GGCTTAATT	3300
	ATGCTAATGT TGGAGGAGAA TGAATAATA AAGTGAATCT TTGCACCTGT GGTTTCTCTC	3360
30	TTTCTCAAT TAAATAATTA TTATCTGTTG TTTACCAACT ACTCAATTC TCTATAAGG	3420
	GACTAAATAT GTAGTCATCC TAAGGGGCAT AACCATTTAT AAAATCATC CTTCAATCTA	3480
	TTTTACCTTA TCATCCTCTG CAAGACATC CTCCTTCAA CCCACAAGCC TTCGTCTC	3540
35	ACAGTCCCT GGGCCATGGA TCCTCACATC CCAATCCGGG GCGCAATTC GCAATCATGG	3600
	TCATAGCTGT TTCCTGTGTG AAATTGTTAT CCGTCCAAA TTCACACAA CATACGAGCC	3660
40	GCAAGCATAA AGTGTAAAGC CTGGGGTGCC TAATGAGTGA GCTAACTCAC ATTAATTGGG	3720
	TTGGCTCAC TGCCCGTTT CCAGTCGGGA AACCTGTCTG GCCAGCTGCA TTAATGAATC	3780
45	GGCCAACGGG CGGGGAGAGG CGGTTTGGGT AFTGGGCGC	3819

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:244:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 43 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 55 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA
- 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:244:

TTCTTCTCC TCCTGGTGGC AGCTCCTAGA TGGGTCTGT CTC 43

65 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:245:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

ES 2 345 580 T3

(A) LONGITUD: 43 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:245:

AGGTGCAGCT ACAGCAGTGG GCGGCAGGAC TGTTGAAGCC TTC 43

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:246:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 43 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:246:

GGAGACCCCTG TCCCTCACCT GCGCTGTCTA TGGTGGTTCC TTC 43

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:247:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 43 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:247:

AGTGGTTACT ACTGGAGCTG GATCCGCCAG CCACCAGGTA AGG 43

50 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:248:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 43 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:248:

GTCTGGAGTG GATTGGTGAA ATCAATCATA GTGGAAGCAC CAA 43

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:249:

ES 2 345 580 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 43 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:249:

TTCACCAATC CACTCCAGAC CCTTACCTGG TGGCTGGCGG ATC 43

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:250:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 43 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:250:

CAGCTCCAGT AGTAACCACT GAAGGAACCA CCATAGACAG CGC 43

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:251:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 43 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:251:

AGGTGAGGGA CAGGGTCTCC GAAGGCTTCA ACAGTCCTGC GCC 43

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:252:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 43 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:252:

CCACTGCTGT AGCTGCACCT GAGACAGGAC CCATCTAGGA GCT 43

ES 2 345 580 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:253:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 48 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:253:

GCCACCAGGA GGAGGAAGAA CCACAGGTGT TGCATGGTGG CAAGCTTG 48

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:254:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:254:

CATGAAACAC CTGTGGTTCT TCC 23

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:255:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 43 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:255:

TCTTGAGAGA CGGGTTGTAG TTGGTGCTTC CACTATGATT GAT 43

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:256:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 43 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:256:

ES 2 345 580 T3

CTAGAAACCG TCTCTCAAGA GTCGAGTCAG CATATCAGTA GAG 43

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:257:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 43 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:257:

20 ACGTCCAAGA ACCAGTTCTC TCTGAAACTG AGCTCTGTGA CCG 43

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:258:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 43 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:258:

CTGCGGACAC GGCTGTGTAT TACTGTGCGA GAGTAATTAA TTG 43

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:259:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 43 pares de bases

45 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:263:

55 ATACACAGCC GTGTCCGAG OGGTCACAGA GCTCAGTTTC AGA 43

60 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:264:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 43 pares de bases

65 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 345 580 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:264:

5 **GAGAACTGGT TCTTGGACGT GTCTACTGAT ATGGTGACTC GAC 43**

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:265:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:265:

GAAGCACCAA CTACAACCCG 20

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:266:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:266:

40 **GAGTTGCACG ACACCGTCAC C 21**

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:267:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

50 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:267:

GAGCTCAAGC TTGCCACCAT GAAACACCTG TGG 33

60 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:268:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 4926 pares de bases

65 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

ES 2 345 580 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:268:

5

GAAGTCGAGC AGCTGAAGCT TGCCACCATG AAACACCTGT GGTTCCTCTC CCTCCTGGTG 60

10

GCAGCTCCTA GATGGGTCTT STCTCAGGTG CAGCTACAGC AGTGGGGCGC AGGACTGTTC 120

AAGCCTTCGG AGACCCCTGT CCTCACCTGC GCTGTCTATG GTGGTTCCTT CAGTGGTTAC 180

15

TACTGGAGCT GGATCCGCCA GCCACCAGGT AAGGGTCTGG AGTGGATTGG TGAAATCAAT 240

CATAGTGGAA GCACCAACTA CAACCCGTCT CTCAAGAGTC GAGTCACCAT ATCAGTAGAC 300

AGTCCAAGA ACCAGTTCTC TCTGAAACTG AGCTCTGTGA CCGCTGGGGA CACGGCTGTG 360

20

EATFACTGTG CGAGAGTAAT TAATTGGTTC GACCCCTGGG GCCAGGGAAC CCTGGTCACC 420

STCTCCTCAG CCTCAACCAA GGGCCCATCG GTCTTCCTCC TGGCACCTTC CTCCAAGAGC 480

25

ACCTCTGGGG GCACAGCGGC CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG 540

ACGGTGTGCT GSAACTCAGG CGCCCTGACC AGCGGGGTGC ACACCTTCCC GGCTGTCTTA 600

30

CAGTCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG CAGCTTGGGC 660

ACCCAGACCT ACATCTGCAA CSTGAATCAC AAGCCCAGCA ACACCAAGGT GGACAAGAAA 720

35

GTGGGTGAGA SGCCAGCACA GGGAGGGAGG ETGTCTGCTG GAAGCCAGGC TCAGCGCTCC 780

TGCCTGGACG CATCCGGGCT ATGCAGCCCC AGTCCAGGGC AGCAAGGAG GCCCCGTCTG 840

CCCTCTCACC CGGAGGCCTC TGCCCGCCCC ACTCATGCTC AGGGAGAGGG TCTTCTGGCT 900

40

TTTTCCCAG SCTCTGGGCA GGCACAGGCT AGGTGCCCTT AACCCAGGCC CTGCACACAA 960

45

50

55

60

65

ES 2 345 580 T3

AGGGGCAGGT GCTGGGCTCA SACCTGCCAA GAGCCATATC CGGGAGGACC CTGCCCTGA 1020
 CCTAAGCCCA CCCAAAGGC CAAACTCTCC ACTCCCTCAG CTCGGACACC TTCCTCTCTC 1080
 5 CCAGATTCCA GTAACCTCCA ATCTTCTCTC TGCAGAGCCC AAATCTTGTG ACAAAACTCA 1140
 CAGATGCCCA CCGTGCCAG GTAAGCCAGC CCAGGCCCTG CCTTCCAGCT CAAGGCCGGA 1200
 10 CAGGTGCCCT AGAGTAGCCT GCATCCAGGG ACAGGCCCCA CCCGGGTGCT GACAGGTCCA 1260
 CCTCCATCTC TTCCTCAGCA CCTGAACCTC TGGGGGGACC GTCAGCTTC CTCTTCCCC 1320
 CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGC GTGGTGGTGG 1380
 15 ACGTGAGCCA CGAGACCCT GAGGTCAAGT TCAACTGSTA CGTGCACGSC GTGGAGGTGC 1440
 ATATGCCAA GACAAAGCCG CCGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCST GTGGTCAGCC 1500
 20 TCCTCACCGT CCTGCCCCAG GACTGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA 1560
 ACAAAGCCCT CCCAGCCCC ATCGAAGAAA CCATCTCCA AGCCAAAGGT GGGACCCGTG 1620
 25 GSGTGCGAGG GCCACATGA CAGAGGCCGG CTCGGCCAC CCTCTGCCCT GAGAGTGACC 1680
 GCTGTACCAA CCTCTGTCC TACAGGGCAG CCCCEAGAC CACAGCTGA CACCCTGCC 1740
 30 CCATCCCGGG ATGAGCTGAC CAAGAACCAG CTCAGCCTGA CCTGCCCTGGT CAAGGCTTC 1800
 TATCCAGCG ACATCGCCGT GGAGTGGAG AGCAATGGGC AGCCCGAGAA CAACTACAAG 1860
 ACCACGCCTC CCGTGTGGA CTCGACGGC TCCTTCTTC TCTACAGCA GCTCACCGTG 1920
 35 GACAAGAGCA GGTGGCAGCA GGGGAACGTC TTCTCATGCT CCGTGAIGCA TGAGGCTCTG 1980
 CACAACCACT ACAAGCAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCCGG GTAATPGAGT GCGACGGCCG 2040
 40 GCAAGCCCCG GCTCCCCGGG CTCTCGCGGT CGCACAGGA TGCITGGCAC GTACCCCTG 2100
 TACATACTTC CCGGGCGCC AGCATGGAAA TAAAGCACCC AGGCTGCCC TGGCCCTTG 2160
 CGAGACTGTG ATGTTCTTT CCACGGSTCA GGCCAGTCT CAGGCTGAG TGGCATGAGG 2220
 45 GAGGCAGAGC GGGTCCCACT GTCCCCACAC TGGCCCAAGC TGTGCAGGTG TGCTTGGGCC 2280
 CCTAGGGTG GGCCTCAGCC AGGGCTGCC CTGGCAGGG TGGGGATT TGCAGGTGG 2340
 50 CCTTCCCTCC AGCAGCACT GOCCTGGGCT GGGCCACGGG AAGCCCTAGG AGCCCTGGG 2400
 GACAGACAA CAGCCCTGC CTCTGTAGSA GACTGTCTG TTCTGTGAGC GCCCCTGTCC 2460
 55 TCCGACCTC CATGCCCACT CCGGGCATG CCTGCAGTC GACTCTAGAG GATCCCCGGG 2520
 TACCGAGCTC GAATTCATCG ATGATATCAG ATCTGCCGGT CTCCTATAG TGAGTCGTAT 2580
 TAATTTCGAT AAGCCAGGTT AACCTGCATT AATGAATCGG CCAAGCGCG GGGAGAGGCS 2640
 60 GTTTCGTAT TGGGGCTCT TCGCTTCTT CGCTACTGA CTCGCTGGC TCGTCTGTTC 2700
 GGCTGCGCG AGCGGTATCA GCTCACTCA AGSCGGTAT ACGGTATCC ACAGAATCAG 2760
 65 GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGGAGCCA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAA 2820

ES 2 345 580 T3

AGGCCGGGTT GCTGGCGTTT TTCATAGCC TCCGCCCCCC TCACGAGCAT CACAAAAATC 2880
 5 GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCCTTCCCC 2940
 CTGGAAGCTC CCTCGTGGC TCCCTGTTT CGACCCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG 3000
 CCTTCTCC CTTGGGAAGC GTGGCGTTT CTCATGCTC AGGCTGTAGG TATCTCRSTT 3060
 10 CGGTGTAGGT CGTCCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCCTT CAGCCCGACC 3120
 GCTGCGCCTT ATCCGGTAACT TATGTCCTG AGTCCACCC GGTAAACAC GACTTATCCG 3180
 15 CACTGGCAGC AGCCACTGCT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG 3240
 AGTCTTGAA GTGGTGGCT AACTACGGCT ACCTAGAAG CACAGTATTT GGTATCTGCC 3300
 CTCTGCTGAA GCCAGTTACC CTCGGAAAA GAGTTGTTAG CTCTTGATCC GGCAPACAAA 3360
 20 CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGGC AGAAAAAAG 3420
 GATCTCAAGA AGATCCCTTG ATCTTTCTA CCGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAACT 3480
 25 CACGTTAAGG GATTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTCACCTAG ATCCTTTTAA 3540
 APTAAAAATC AAGTTTTAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAACCTGG TGTGACAGTT 3600
 30 ACCAATGCTT AATCAGTGG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG 3660
 TTGCTGACT CCCCCTGCTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA 3720
 35 GTGCTGCAAT GATACCGGA GACCCAGCT CACCGGCTCC AGATTATCA GCAATAAAC 3780
 AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCTGCAAC TTTATCGGCC TCCATCCAGT 3840
 CTATTAATG TTGCCGGGA GCTAGAGTAA GIAGTTCCGC AGTTAATAGT TTGCCAACG 3900
 40 TTGTTCCAT TGCTACAGGC ATGTTGGTGT CAGGCTGCTG GTTTGGTATG GCTTCATTCA 3960
 GCTCCGTTT CCAACGATCA AGGCGAGTA CATGATCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG 4020
 45 TTAGCTCCTT CGTCTCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GSCCGACTG TATCACTCA 4080
 TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATCTCTTA CTGTCAIGCC ATCGTAAGA TGCTTTCTG 4140
 TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATCT GAGAATAGTG TATCGGGCGA CCGAGTTGCT 4200
 50 CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG CCCCACATAG CAGAAGTTA AAAGTGTCA 4260
 TCATTGGAAA ACGTTCTTCG GGGGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCIG TTGAGATCCA 4320
 55 GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG 4380
 TTTCTGGGTG AGCAAAACA CGAAGCCAAA ATGCCGCAA AAAGGAATA AGGGCGACAC 4440
 60 GGAATGTTG AATACTATA CTCTTCCTT TCAATATTA TTGAAGCAT TATCAGGCTT 4500
 ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAACAA ATAGGGGTT 4560
 CGCGCACATT TCCCCGAAA GTGCCACTG ACGTCTAAGA AACCATTAAT ATCATGACAT 4620
 65 TAACTTATAA AAATAGGCGT ATCAGAGCC CTTTTGTTT CCGCGTTT 6680

ES 2 345 580 T3

	GTGAAAACCT CTGACACATG CAGCTCCCGG AGACCGTCCAC AGCTTGCTCTG TAAGCGGATG	4740
5	CCGGGAGCAG ACAAGCCCGT CAGGGCGCGT CAGCGSGTGT TGGCSGGTGT CGGGGCTGGC	4800
	TTAACTATGC GGCATCAGAG CAGATTGTAC TGAGAGTGCA CCATATGGAC ATATTGTCGT	4860
	TAGAACCGGG CTACAATTAA TACATAACCT TATGTATCAI ACACATACGA TTTAGGTGAC	4920
10	ACTATA	4926

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:269:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 15 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 20 (C) STRANDEDNESS: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- 25 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:269:

AGCTTTACCA GCTAG 15

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:270:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
 - 35 (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:270:

TACTGGTACT TCGATCTC 18

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:271:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 27 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - 55 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:271:

CAGGGGGGGG ATAGGTA CTT CGATCTC 27

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:272:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 12 pares de bases

ES 2 345 580 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:272:

10

GCTTTTGATA TC 12

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:273:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

15

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

20

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:273:

25

CATTGGCTAA ATGGGGATGC TTTTGATATC 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:274:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

30

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

35

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

40

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:274:

CGGGATTACG ATATTTTGAC TGGTTATTAT GCGGCTTTTG ATATC 45

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:275:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

50

(A) LONGITUD: 12 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

55

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:275:

60

TACTTTGACT AC 12

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:276:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

65

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

ES 2 345 580 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:276:

AGTTTTTCCG ACTAC 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:277:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 50 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:277:

GGGTATTATT ATGATTCCGG GACTTATTAT AAGTCTACCC CTTTGACTAT 50

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:278:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:278:

CTAAGTGGCC TGTTTAACTA G 21

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:279:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:279:

CATCTTACT TTGACTAC 18

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:280:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 345 580 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:280:

5 **AGGTTTACCA GCCAA** 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:281:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:281:

CAAGGGTTTG ACTAC 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:282:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:282:

AGTTTTAGCA GCTAC 15

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:283:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

45 (A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:283:

55 **AGCTTTACCA ACTAC** 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:284:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

60 (A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

65 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

ES 2 345 580 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:284:

CAAAC TTTTG ACTAC 15

5
(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:285:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:285:

CATGGTATAG CAGCAGCTGG TACGTGGTTC GACCCC 36

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:286:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:286:

AGCTTTTCCA GTTAC 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:287:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:287:

CAGGGCTACT TTGACTAC 18

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:288:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:288:

ES 2 345 580 T3

GCCGGGTATA CCAGCAGCTG GTTCTTTGAC TTC

33

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:289:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:289:

AGGTTTCCCA TCTAC 15

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:290:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:290:

35 GTGGTTCGGG GATTATTAT TACTTTGAC TAC 33

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:291:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

45 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:291:

50 AGCTTAACCA GTTAT 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:292:

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

60 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:292:

ES 2 345 580 T3

CAAAGGGGTA CTTTGACTAC 20

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:293:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:293:

GGATCGTGGT ACTTTGACTA C 21

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:294:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:294:

35 AACTGGTTGG AGCCC 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:295:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

40 (A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

45 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:295:

50 AACTTTACCA CCTAC 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:296:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

60 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:296:

65 CTCCCCAATG ACAGTTGGTT CGACCCC 27

ES 2 345 580 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:297:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:297:

CGGGGGTACT ATGGTTCGGG GAGTTATTAT AACTGGTTCG ACCCC 45

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:298:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:298:

TACTACTACT ACTACGGTAT GGACGTC 27

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:299:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:299:

AACTTTATCA CGTAC 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:300:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:300:

ES 2 345 580 T3

CATGAGCAGC TGGTACAGGG TTACTACTAC TACGGTATGG ACGTC 45

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:301:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:301:

20 ACCTTTACCA GTTAC 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:302:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:302:

35 GATATGGGGG GGGCCTCCTA CTTCTACTTC GGTATGGACG TC 42

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:303:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

45 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:303:

55 AGCTTTGCCA ACTAG 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:304:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

65 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

ES 2 345 580 T3

TTTTCTGGCC TGACAACCAG GGTGGCGCAG GATGCTCAGT GCAGAGAGGA AGAAGCAGGT 60
 GGTCTCTGCA GCTGGAAAGCT CAGCTCCCAC CCGCTGCTT TGCATGTCCC TCCCAGCTGC 120
 5 CCTACCTTCC AGAGCCCATATA TCAATCCCTG TCTCAGAGCC CTGGGGAGGA ACTGCTCAGT 180
 TAGGACCCAG AGGGAACC ATG GAA GCC CCA CCT CAG CTT CTC TTC CTC CTG 231
 10 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu
 1 5 10
 CIA CTC TGG CTC CCA G GTGAGGGGGA ACCATGAGGT GSTTTTGCAC 277
 15 Leu Leu Trp Leu Pro
 15
 ATTAGTGAAA ACTCTTGCCA CCTCTGCTCA GCAAGAAATA TAAATAAAT TCAAAGTATA 337
 TCAACAATTT TGGCTCTACT CAAAGACAGT TGGTTTGATC TTCATTACAT GAGTGCATTT 397
 20 CTGTTTTATT TCCAAATTTCA G AT ACC ACC CGA GAA ATT CTG TTG ACA CAG 447
 Asp Thr Thr Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln
 20 25
 TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC 495
 30 Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
 30 35 40
 35
 TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGC TAC CAA CAG 543
 40 Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 45 50 55
 AAA CCT GGC CAG CCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG 591
 45 Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg
 60 65 70
 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA CAC 639
 50 Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 75 80 85 90
 TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CIA GAG CCT GAA CAT TTT GCA GTT TAT 687
 55 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
 95 100 105
 TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CCT CCCACAGTGA TTCCACATGA 734
 60 Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
 110 115
 AACAAAAACC CCAACAAGAC CATCAGTGT TACTAGATTA TTATACCAGC TGCTTCCTTT 794
 ACAGACAGCT AGTGGGGT 812
 65

ES 2 345 580 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:307:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 115 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:307:

```
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
  1                    5                    10                    15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
          20                    25                    30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
          35                    40                    45
Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
          50                    55                    60
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
          65                    70                    75                    80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
          85                    90                    95
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
          100                    105                    110
Asn Trp Pro
          115
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:308:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 900 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) UBICACIÓN: join(180..228, 398..693)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:308:

ES 2 345 580 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:309:

5

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

10

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

15

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly
35 40 45

20

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

25

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Pro Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

30

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Asn Trp His
115

35

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:310:

40

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 900 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

45

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

50

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: join(116..164, 352..650)

55

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:310:

60

65

ES 2 345 580 T3

	CCGCCCCAGC TGCTTTGCAT GTCCTCCCA GCGGCCCTGC AGTCCAGAGC CCATATCAAT	60
5	GCTGGGTCA GAGCTGTGA GAAGAGCTGC TCAGTTASGA ACCCCAGAGG GAACC ATG Met 1	118
10	GAA ACC CCA GCG CAG CTT CTC TTC CTC CTG CTA CTC TGG CTC CCA G Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro 5 10 15	164
15	GTGAGGGGAR CATGGGATGG TTTTGCATGT CAGTGAARAC CCTCTCAAGT COTGTTAGCT GGCAACTCTG CTCAGTCAAT ACAATAATTA AAGCTCAATA TAAAGCAATA ATTCTGGCTC TTCTGGGAAG ACAATGGGTT TGATTTAGAT TACATGGGTG ACFTTCTGT TTTATTTCCA	224 284 344
20	ATCTCAG AT ACC ACC GGA GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr 20 25 30	392
25	CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser 35 40 45	440
30	CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly 50 55 60	488
35	CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly 65 70 75	536
40	ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu 80 85 90	584
45	ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln 95 100 105 110	632
50	CAG TAT GGT AGC TCA CCT CCCACAGTGA TTCAGCTTCA AACAAAAACC Gln Tyr Gly Ser Ser Pro 115	680
55	TCTGCAAGAC CTTTATTTGT TACTAGATTA TACCAGCTGC TTCCTTTACA GATAGCTGCT GCAATGACAA CTCATTTTAG CATCTCTCTC TGCTTGGGCA TTTTGGGGAT CTUAAAAAG TAATCCCTTG AATATTTTTT GACTCTGATT CCTGCATTTT TCCTCAGACC AAGATGGACA GCCAGTTTA AGCACAGTTT CACAGTAATG GCCACTGGAT	740 800 860 900

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:311:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 116 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:311:

ES 2 345 580 T3

	Met	Glu	Thr	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Pro
	1				5				10						15	
5	Asp	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser
				20					25					30		
10	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser
			35					40					45			
15	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala
	50						55					60				
20	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro
	65				70						75					80
25	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
					85					90					95	
30	Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr
				100					105					110		
	Gly	Ser	Ser	Pro												
			115													

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:312:

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 847 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 40 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- 45 (ix) RASGO:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 - (B) UBICACIÓN: join(226..280, 406..701)
- 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:312:

	AAACACATTC TCTGCAGACA AATTTGAGCT ACCTTGATCT TACCTGGACA GGTGGGGACA	60
55	CTGAGCTGGT GCTGAGTTAC TCAGATGGGC CAGCTCTGCA GCTGTGCCCA CCCTGCCCA	120
	TCCCCTGCTC AATTTGCATGT TCCCAGAGCA CAACCTCCTC CCCTGAAGCC TTAFTARTAG	180

60

65

ES 2 345 580 T3

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 5 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 10 Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys
 50 55 60
 15 Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80
 20 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95
 25 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110
 30 Tyr Asn Ser Tyr Pro
 115

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:314:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 134 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:314:

GCCTCGGACA CCGCCATGTA TTACTGTGTG AGACATTTAT GGTTCGGGGA GTTACGCGGT 60

GTGAACGTCT GGGGCCAAGG GACCACGGTC ACCGTCTCTCT CAGCCCAABAC GACACCCCCA 120

TCTGTCTATC CACT 134

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:315:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 125 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:315:

ES 2 345 580 T3

GCCTCGGACA CCGCCATGTA TTA CTGTGCG AGACACTGGG CATTGGATGC TCTTGATGTC 60
TGGGGCCAAG GGACAATGCT CACCGTCTCT TCAGCCAAAA CGACACCCCC ATCTGTCTAT 120
5 CCACT 125

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:316:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 122 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:316:

GCCTCGGACA CCGCCATGTA TTA CTGTGCG AGAACTGGG ATGATGCTTT TGATATCTGG 60
25 GGCCAAGGGA CAATGGTCAC CGTCTCTTCA GCCAAAACAA CACCCCCATC AGTCTATCCA 120
CT 122

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:317:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 122 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:317:

GACTCGGACA CCGCCATGTA TTA CTGTGCG AGACAGGGGA GAGATGCTTT AGATATCTGG 60
45 GGCCAAGGGA CAATGGTCAC CGTCTCTTCA GCCAAAACAA CACCCCCATC AGTCTATCCA 120
CT 122

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:318:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 137 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:318:

65

ES 2 345 580 T3

	GCCTCGGACA CCGCCATGTA TTATTGTGTG AGACATAGGS ACTATATTC GGGGAGTTAT	60
	TTTCCTGACT ACTGGGGCCA GGGAACCCCTG GTCACCGTCT CCTCAGCCAA AACAACACCC	120
5	CCATCAGTCT ATCCACT	137

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:319:

- 10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 116 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 15 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

- 20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:319:

	GCCTCGGACA CCGCCATGTA TFACTGTGGG AGACATGGGT CTATCGATAT CTGGGGCCAA	60
	GGGACAATGG TCACCGTCTC TCAGCTACA ACAACAGCCC CATCTGTCTA TCCCTT	116

25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:320:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 128 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - 35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:320:

	GCCTCGGACA CCGCCATGTA TFACTGTGGG AGAGAGAGGG GTCACTGGGE ATCGTTTGAC	60
	TATGGGGCC AGGGAACCCCT GGTACCGTCT TCCTCAGCTA CAACAACAGC CCCATCTGTC	120
45	TATCCCTT	128

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:321:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 125 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - 55 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:321:

	GCCTCGGACA CCGCCATGTA TFACTGTGGG AGAAGGGACC CCCCTGATGC TTTTGATATC	60
	TGGGGCCAAAG GGACAATGGT CACCGTCTCT TCAGCTACAA CAACAGCCCC ATCTGTCTAT	120
65	CCCTT	125

ES 2 345 580 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:322:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 131 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:322:

```

5      GCCTCGGACA CCGCCATGTA TTACTGTGGG AGACGGGGG CTTACTACTA CTACGGTATG      60
      GACGTCTGGG GCGAAGGGAC CACGGTCAEC GTCTCCTCAG CTACAACAAC AGCCCCATCT      120
      GTCTATCCCT T      131
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:323:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1674 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:323:

```

35      CGAGAGGGGC GGGGGGAAGA CTAATATCCC AGGCAGGTTT TAGGTCCAG AGTCTGCCAG      60
      AAATCCCACC ATCTACCCAC TGACACTCCC ACCAGTCCCTG TGCAGTGATC CCGTGATAAT      120
40      CGGCTGCCTG AFTCAGGATT ACTTCCCTTT CGGCACGATG AATGTGACCT GGGGAAAGAG      180
      TGGGAAGGAT ATAACCACCG TGAACCTTCC ACCTGCCCTC GCCTCTGGGG GACGGTACAC      240
45      CATGAGCAGC CAGTTAACC TCACAGCTGT CGAGTCCCA GAAGGAGAGT CCGTGAAATG      300
      TTCCGTGCAA CATGACTCTA ACCCGTCCA AGAATTGGAT GTGAATGCT CTGGTAAAGA      360
50      ACCTTAGGGG CTCAGCTAGG GGTGGGATAA GTCCACCTT ATCTAGATCC ATATATCCCT      420
      CTGATGCACA CCTCACAGG AATCCCTCAG AAACCTCCAC TATGGGGATT GGGGAAGGA      480
55      AGCGTAAACA GGTCTAGAAG GAGCTGGAGG CCTCAGAACA TCCAGAAACG GGGACAGCAA      540
      AGGAGACAAG GAGAATATAC TGATTTGCTA GGACATCTTC TGTTACAGGT CTTACTCCTC      600
      CTCTCCTAT TACTATTCTT TCTTCCAGC CCAGCCTGTC ACTGCAGCGG CCAGCTCTTG      660
60      AGGACCTGCT CCTGGGTTCA GATGCCAGCA TCACATGTAC TCTGAATGGC CTGAGAAATC      720
      CTGAGGGAGC TGCTTTCACC TGGGAGCCCT CCACTGGGAA GGATGCAGTG CAGARGAAAG      780
65      CTGCGCAGAA TTCTTGGGCC TGCTACAGTG TGTCAGCGT CCTGCCTGGC TGTGCTGAGC      840
    
```

ES 2 345 580 T3

	GCTGGAACAG TGGGGCATCA TTCAAGTGCA CAGTTACCCA TCCTGAGTCT GGCACCTTAA	900
5	CTGGCACAAT TGCCAAAGTC ACAGGTGAGC TCAGATGCAT ACCAGGACAT TGTATGACGT	960
	TCCTTGCTCA CATGCOCTGCT TTCTTCCTAT AATACAGATG CTCAACTAAC TGCCCATGTC	1020
	CTTATATCAC AGAGGGAAAT TGGAGCTATC TGAGGAACTG CCCAGAGGGG AAGGGCAGAG	1080
10	GGGTCCTGCT CTCCTTGTCT GAGCCATAAC TCTTCTTTCT ACCTTCCAGT GAACACCTTC	1140
	CCACCCCAGG TCCACCTGCT ACCGCCGCCG TCGGAGGAGC TGGCCCTGAA TGAGCTCTTG	1200
15	TCCTTGACAT GCCTGGTGCG AGCTTTC AACCTAAAGAAG TECTGCTGCG ATGGCTGCAT	1260
	GGAAATGAGG AGCTGTCCCC AGAAAGCTAC CTAGTGTITS AGCCCTAAA GGAGCCAGGC	1320
20	GAGGGAGCCA CCACCTACCT GGTGACAAGC GTGTTGGGTG TATCAGCTGA AACCTGGAAA	1380
	CAGGGTGACC AGTACTCCTG CATGGTGGGC CACGAGGCCCT TGCCCATGAA CTTCACCCAG	1440
25	AAGACCATCS ACCGTCTGTC GGGTAAACCC ACCAATGTCA GCGTGTCTGT GATCATGTCA	1500
	GAGGGAGATG GCATCTGCTA CTGAGCCACC CTGCCTGTCC CTACTCCFAG AATAAACTCT	1560
	GTGCTCATCC AAAGTATCCC TGCACTTCCA CCCAGTGCCT GTCCACCACC CTGGGGTCTA	1620
30	CGAAACACAG GGAGGGGTCA GGGCCAGGG AGGGAGAAAT ACCACCCACT AAGC	1674

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:324:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 133 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: liner

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:324:

	GGCTCGGACA CCGCCATGTA TTACTGTGTG AGACAATTAT GGTTCGGGGA GTTACGGGGT	60
50	GTGAACGTCT GGGCCAAGG GACCACGGTC ACCSTCTCCT CAGCCAAAC GACACCCCCA	120
	TCTGTCTATC CAC	133

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:325:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 124 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:325:

ES 2 345 580 T3

	GCCTCGGACA CCGCCATGTA TTA CTGTGCG AGACACTGGG CATTGGAIGC TCTTGATGTC	60
5	TGGGGCCAAG GGACAA TGCT CACCGTCTCT TCAGCCAAA CGACACCCCC ATCTGTCTAT	120
	CCAC	124

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:326:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 121 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:326:

	GCCTCGGACA CCGCCATGTA TTA CTGTGCG AGAACTGGGG ATGATGCTTT TGATAFCTGG	60
25	GGCCAAGGGA CAATGGTCAC CGTCTCTTCA GCCAAAACAA CACCCCCATC AGTCTATCCA	120
	C	121

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:327:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 121 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:327:

	GACTCGGACA CCGCCATGTA TTA CTGTGCG AGACAGGGGA CAGATGCTTT AGATATCTGG	60
45	GGCCAAGGGA CAATGGTCAC CGTCTCTTCA GCCAAAACAA CACCCCCATC AGTCTATCCA	120
	C	121

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:328:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 136 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:328:

ES 2 345 580 T3

GCCTCGGACA CCGCCATGTA TTATTGTGTG AGACATAGGG ACTATATTTC GGGGAGTTAT 60
TTTCCTGACT ACTGSGGCCA GGGAAACCCTG GTCACCGTCT CCTCAGCCAA AACAAACACC 120
5 CCATCAGTCT ATCCAC 136

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:329:

- 10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 115 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
15 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:329:

25 GCCTCGGACA CCGCCATGTA TTACTGTGCG AGACATGGGT CTATGSATAT CTGGGGCCAA 60
GGGACAATGG TCACCGTCTC TTCAGCTACA ACPACAGCCC CATCTGTCTA TCCCT 115

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:330:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 127 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
35 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:330:

45 GCCTCGGACA CCGCCATGTA TTACTGTGCG AGAGAGACCG GTCACTGGGG ATCGTTTGAC 60
TATTGGGGCC AGGGAACCCT GGTACCGTCT TCCTCAGCTA CAACAACAGC CCCATCTGTC 120
TATCCCT 127

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:331:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 124 pares de bases
55 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:331:

65

ES 2 345 580 T3

GCCTCGGACA CCGCCATGTA TTACTGTGCG AGAAGGGACC CCGCTGATGC TTTTGATATC 60

5

TGGGGCCAAG GGACAATGGT CACCGTCTCT TCAGCTACAA CACAGCCCC ATCTGTCTAT 120

10 **CCCT** 124

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:332:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 130 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:332:

25 **GCCTCGGACA CCGCCATGTA TTACTGTGCG AGACGGGGGC CTTACTACTA CTACGGSTATG 60**

CACCTCTGGG GCCAAGGGAC CACGGTCACC CTCTCCTCAG CTACAACAAC AGCCCCATCT 120

30 **GTCTATCCCT 130**

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:333:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 246 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

40 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:333:

45 **TCTCTGAAGA TCTCCTGIAA GGGTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG 60**

GTGCGCCAGA TGCCCGGAAA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCACTATCC TGGTACTCT 120

50 **GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTCCPAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180**

ASACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240

55 **GCGAGA 246**

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:334:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

65 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 345 580 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:334:

5 TAGTGGTACT TCGATCTCTG GGGCCGTGGC AC 32

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:335:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 293 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:335:

20 TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG 60
GTGCGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTGACTCT 120
25 GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCOAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180
AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
30 GCGAGACAAG GGA CTGGGGA GGA CTGGTAC TTCGATCTCT GGGCCGTGG CAC 293

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:336:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 290 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

40 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:336:

45 TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG 60
GTGCGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTGACTCT 120
50 GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCOAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180
AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
55 GCGAGACAGA AAGGGGGAAG GGGTACTTC GATCTCTGGG GCCCTGGCAC 290

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:337:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 287 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

65 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

ES 2 345 580 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:337:

```
TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG      60
5  GTGCGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCATCTATCC TGGTACTCT      120
  GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC      180
10  AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT      240
  GCGAGAACTG GGTGGTACTG GACTTCGAT CTCTGGGGCC GTGGCAC      287
```

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:338:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

20 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:338:

```
GCTTTTGATA TCTGGGGCCA AGGGAC      26
```

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:339:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

35 (A) LONGITUD: 293 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

40 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:339:

```
TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG      60
45  GCGCGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCATCTATCC TGGTACTCT      120
  GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC      180
50  AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT      240
  GCGAGACATG AACTGGGGA TCCGGGGCT TTGATATCT GGGGCAAGG GAC      293
```

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:340:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

60 (A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

65 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

ES 2 345 580 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:340:

TACTTTGACT ACTGGGGCCA GGGAAC 26

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:341:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 305 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:341:

20	TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTAA CCAGCTACTG GATCGGCTGG	60
25	GTGGGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTACTCT	120
30	GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTCCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC	180
35	AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT	240
40	GCGAGAACGG ATTACGATAT TTTGACTGCT TATTATAACC CTTTIGACTA CTGGGCCAG	300
45	GGAAC	305

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:342:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 284 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:342:

50	TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTAA CCAGCTACTG GATCGGCTGG	60
55	GTGGGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTACTCT	120
60	GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTCCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC	180
65	AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT	240
70	GCGAGTATAG CAGCAGCCCT TTTGACTAC TGGGGCCAGG GAAC	284

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:343:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 290 pares de bases

ES 2 345 580 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:343:

10 TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG 60
GTGCGCCAGA TGCCCGGAA AGGECTGGAG TGGATGGGA TCATCTATCC TGGTACTCT 120
GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180
15 AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
GCGAGATCTC TACTATGGTT CGGGGAGTTT GACTACTGGG GCGAGGGAAC 290

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:344:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

25

(A) LONGITUD: 305 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:344:

35 TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG 60
GTGCGCCAGA TGCCCGGAA AGGECTGGAG TGGATGGGA TCATCTATCC TGGTACTCT 120
40 GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180
ASCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
45 GCGAGACTCG ATTACGATAT TTTGACTGGT TATTATAACC CCTTIGACTA CTGGGGCCAG 300
GGAAC 305

50

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:345:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

55

(A) LONGITUD: 305 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

60

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:345:

65

ES 2 345 580 T3

	TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGECTGG	60
5	GTGCGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCACTATCC TGGTGACTCT	120
	GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTACCA TCTCGGCCGA CAAGTCCATC	180
	AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTGG ACACCGCCAT GTATTACTGT	240
10	GCGAGACTCG ATTACGATAT TTTGACTGGT TATTATAACC CCTTGACTA CTGCGCCAC	300
	GGAAC	305

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:346:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 293 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:346:

	TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGCTGG	60
30	GTGCGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCACTATCC TGGTGACTCT	120
	GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC	180
35	AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTGG ACACCGCCAT GTATTACTGT	240
	GCGAGCCCGT ATAGCAGCAG CTGGTACAGG TTTGACTACT GGGGCCAGGG AAC	293

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:347:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 41 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:347:

	TACTACTACT ACTACGGTAT GGACGTCTGG GGCCAAGGGA C	41
--	---	----

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:348:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 317 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

ES 2 345 580 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:348:

	TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG	60
5	GTGCGCCAGA TGCCCGGGA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTGACTCT	120
	GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCGAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAACTCCATC	180
10	AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT	240
	GGGAGAGAGG GGGGGTTTA TTA CTATGGT TCGGGGAGTT ATTACTACTA CGGTATGGAC	300
15	GTCTGGGGCC AAGGGAC	317

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:349:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 305 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:349:

	TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG	60
30	GTGCGCCAGA TGCCCGGGA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTGACTCT	120
	GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCGAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC	180
35	AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT	240
	GGGAGAGAGG GAACTGGGGA CCATTACTGC TACTACTACG GTATGGACGT CTGGGGCCAA	300
40	GGGAC	305

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:350:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 39 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:350:

TACTGGTACT TCGATCTCTG GGGCCGTGGC ACCCTGGTC 39

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:351:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 303 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla

ES 2 345 580 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:351:

5 TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTCG TCAGCTACTG GATCGGCTGG 60
GTGCGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTACTCT 120
10 GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCOAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 130
AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
15 GCGAGACAGG GACTGGGGAT CGGGGAATGG TACTTCGATC TCTGGGGCCG TGCCACCCTG 300
ETC 303

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:352:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:352:

35 GCTTTTGATA TCTGGGGCCA AGGGACAATG GTC 33

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:353:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 291 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:353:

50 TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACGGGTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG 60
GTGCGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTACTCT 120
55 GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCOAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 130
AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
60 GCGGTAAACT GGGATCGGGC TTTTGATATC TGGGGCCAAG GGACAATGGT C 291

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:354:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

ES 2 345 580 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:354:

10

TACTTTGACT ACTGGGGCCA GGGAACCCTG GTC 33

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:355:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 297 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

25

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:355:

TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCGTGA TACAGCTTTA CCGECTACTG GATCGGCTGG 60

30

GTGGCCAGA TACCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTGACTCT 120

GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180

35

AGTACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTGGG ACACCGCCAT GTATTCTGT 240

40

GCGAGACATA AGGCGGGGAT CAACTACTTT GCCTACTGGG GCCAGGGAAC CCTGGTC 297

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:356:

45

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 297 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

50

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

55

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:356:

TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCGTGA TACACTTCA CCGCTACTG GATCGGCTGG 60

60

GTGGCCAGA TACCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTGACTCT 120

GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180

65

AGTACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTGGG ACACCGCCAT GTATTCTGT 240

GCGAGACATA AGGCGGGGAT CAACTACTTT GCCTACTGGG GCCAGGGAAC CCTGGTC 297

ES 2 345 580 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:357:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 297 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:357:

```
5          TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAACITTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG      60
          GTGCGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCAICTATCC TGGTGACTCT      120
15         GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCAACG TCCAGCCCA CAGTCCATC      180
          AGCACCOCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTGGG ACACCGCCAT GTATTACTGT      240
25         GCGACGACT GGGGAGAAGG GTATTACTTT GACTACTGGG GCCAGGSAAC CCTGGTC      297
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:358:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 282 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:358:

```
40         TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGTTITA CCAGCTACTG GATCGGCTGG      60
          GTGCGCCAGA TGCCCGGCA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTGACTCT      120
45         GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCAACA TCTCAGCCGA CAGTCCATC      180
          AGCACCOCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTGGG ACACCGCCAT GTATTACTGT      240
50         GCGAGACABC TGGTTGACTA CTGGGGCCAG GGAACCCTGG TC      282
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:359:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 312 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:359:

ES 2 345 580 T3

```

TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCGTGA TACAGCTTTA TCAGCTACTG GATCGGCTGG      60
GTGGGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTGACTCT      120
5  GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC      180
AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT      240
10  GCGAGACTGT ATTACTATGG TTCGGGGAGT TACCACAAC TGGTTCGACC CTGGGGCCAG      300
GGAACCCTGG TC                                                                    312

```

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:360:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:360:

```

AAC TGGTTCG ACCCCTGGGG CCAGGGAACC CTGGTC      36

```

30

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:361:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 318 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:361:

```

45  TCTCTGARGA TCTCCTGTAA GGTTCGTGA TACAACITTE CCAGCTACTG GATCGGCTGG      60
GTGGGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCACATATCC TGGTGACTCT      120
50  GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC      180
AACACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT      240
55  GCGAGACAGG GGTATTACTA TGGTTCGGCA AATTATTATA ACATTTGGTT CGACCCCTGG      300
GGCCAGGGAA CCTTGGTC                                                                    318

```

60 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:362:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 48 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

65

ES 2 345 580 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:362:

5 TACTACTACT ACTACGGTAT GGACGTCTGG GGCCAAGGGA CCACGGTC 48

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:363:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 297 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:363:

TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTCTGGA TATAGTTTTG CCAACTACGG GATCGGCTGG 60

GTGCGCCAGA TGCCCGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTGACTCC 120

25 GGTTCAGAT ACAGCCCGTC CTCCAGGC CAGGTCAACA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180

30

AACACCCCT ACCTGCAATG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT STATTAAGT 240

GCGCCCGGG CTTACTACTA CTACGGTATG GACGTCTGGG GCGAAGGAG CAGGTC 297

35

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:364:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

40 (A) LONGITUD: 156 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

45 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:364:

50 TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTCTGGA TACAGTTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG 60

GTGCGCCAGA TGCCCGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTGACTCT 120

55 GATACAGAT ACAGCCCGTC CTCCAGGC CAGGTC 156

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:365:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 156 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

65 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 345 580 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:365:

5 TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGTACTG GATCGGCTGG 60
GTGCGCCAGA TGCCCGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCATCTATCC TGGTACTCT 120
10 GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTC 156

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:366:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 156 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:366:

25 TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGTACTG GATCGGCTGG 60
GTGCGCCAGA TGCCCGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCATCTATCC TGGTACTCT 120
30 GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTC 156

35 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:367:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 156 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:367:

45 TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAACTACTG GATCGGCTGG 60
50 GTGCGCCAGA TGCCCGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCATCTATCC TGGTACTCT 120
GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTC 156

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:368:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 60 (A) LONGITUD: 156 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
65 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:368:

ES 2 345 580 T3

TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG 60
 GTGCGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCACCTATCC TGGTACTCT 120
 5 GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTCCAGGC CAGGTC 156

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:369:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 294 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:369:

TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG 60
 25 GTGCGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCACCTATCC TGGTACTCT 120
 GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTCCAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180
 30
 AGCACCGCCT ACCTCGAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
 35 GCGAGACAGG GGGGGGATAG GTACTTCGAT CTCTGGGGCC GTGGCACCTT GGTG 294

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:370:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 297 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

45 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:370:

TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG 60
 55 GTGCGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCACCTATCC TGGTACTCT 120
 GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTCCAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180
 AGCACCGCCT ACCTCGAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
 60 GCGAGACATT GGCTAATATGG GGTGCTTTT GATATCTGGG GCCAAGGAC AATGGTC 297

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:371:

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 312 pares de bases

ES 2 345 580 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:371:

10 TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG 60
GTGGCCAGAG TGCCCGGGAA AGGCTTGGAG TGGATGGGA TCATCTATCC TGGTGACTCT 120
15 GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180
AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AGGGCTCGG ACAGTGTAT GTATTACTGT 240
20 GCGAGACGGG ATTACGATAT TTTGACTGGT TATTATGCGG CTTTGTATAT CTGGGGCCAA 300
GGGACAATGG TC 312

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:372:

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 317 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

35

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:372:

40 TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGTTTTT CCAGCTACTG GATCGGCTGG 60
GTGGCCAGAG TGCCCGGGAA AGGCTTGGAG TGGATGGGA TCATCTATCC TGGTGACTCT 120
45 GACACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAGGGC CAGGTCACCA TCTCAGTCGA CAAGTCCATC 180
AACACCGCCT TCTGCAGTG GAACACCTG GAGGCTTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
50 GCGAGAGGGT ATTATTATGA TTCGGGACT TATTATAAGT CTACCCCTTT GACTATTGGG 300
GCCAGGGAAC CCTGGTC 317

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:373:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 288 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

60

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:373:

65

ES 2 345 580 T3

TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTICTGGA TACAGTTTTT CCGACTACTG GATCGGCTEG 60
 GTGCGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCATCTATCC TGGTACTCT 120
 5 GACACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCAGGGC CAGGTCTCCA TCTCAGTGA CAAGTCCATC 180
 AACACCGCCT TCCTGCAGTG GAACACCCIG GAGGCTTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
 10 GCGAGACTAA CTGGCCTCTT TAACTATTEG GGCCAGGGAA CCTGGTTC 288

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:374:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 285 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 20 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:374:

TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTICTGGA TACAGTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG 60
 GTGCGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCATCTATCC TGGTACTCT 120
 30 GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCAGGGC CAGGTCTCCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180
 AGCACCAGCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCTTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
 35 GCGAGACATC TTTACTTTGA CTACTGGGGC CAGGGAAACC ASGTTC 285

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:375:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 282 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 45 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:375:

TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTICTGGA TACAGCTTTA CCAGCCAATG GATCGGCTGG 60
 GTGCGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCATCTGGCC TGGTACTCT 120
 55 GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCAGGGC CAGGTCTCCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180
 AGTACCAGCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCTTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
 60 GCGAGACAAG GTTTGACTA CTGGGGCCAG GGAACCTGG TC 282

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:376:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 285 pares de bases

ES 2 345 580 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:376:

10 TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCGTGA TACAGTTTTA GCACCTACTG GATCGGCTGG 60
GTGCGCCAGA TGCCCCGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCATCTATCC TGGTGACTCT 120
15 GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180
AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
GCGAGACATC TTTACTTTGA CTACTGGGGC CAGGGAACCC AGGTC 285

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:377:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

25

(A) LONGITUD: 282 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:377:

35 TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCGTGA TACAGCTTTA CCAACTACTG GATCGGCTGG 60
GTGCGCCAGA TGCCCCGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCATCTATCC TGGTGACTCT 120
40 GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180
AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
45 GCGAGACAAA CTTTTGACTA CTGGGGCCAG GGAACCCTGG TC 282

45

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:378:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

50

(A) LONGITUD: 303 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

55

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:378:

60

65

ES 2 345 580 T3

TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG 60
 GTGGCCGAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCATCTATCC TGGTACTCT 120
 5 GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTCCAAGGC CAGGTACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180
 AGGACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
 10 GCGAGACATG GTATAGCAGC AGCTGGTACG TGGTTCGACC CCTGGGGCCA GGGAAACCTG 300
 GTC 303

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:379:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 285 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:379:

TCTCTGAAGA TCTCCTGTAG GGGTTCTGGA TACAGCTTTT CCAGTACTG GATCGCCTGG 60
 GTGGCCGAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCATCTATCC TGGTACTCT 120
 35 GAAACCAGAT ACAGTCCGTC CTCCAAGGC CAGGTACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180
 AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
 40 GCGAGACAGG GCTACTTTGA CTACTGGGGC CAGGGAACCC TGGTC 285

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:380:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 285 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:380:

TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG 60
 GTGGCCGAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCATCTATCC TGGTACTCT 120
 60 GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTCCAAGGC CAGGTACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180
 AGTACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTGG ACACCGCCAT TTATTACTGT 240
 65 GCGAGACATC TTTACTTTGA CTACTGGGGC CAGGGAACCC AGTTC 285

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:381:

ES 2 345 580 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 297 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:381:

```
TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTOGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG      60
GTGCGCCAGA TCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTACTCT      120
GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC      180
AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT      240
GCGGCCGGGT ATACCAGCAG CTGGTTCTTT GACTTCTGGG GCCAGGCAAC CCTGGTC      297
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:382:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 285 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:382:

```
TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGSTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG      60
GTGCGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGSTGACTCT      120
GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC      180
AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATCGCTGT      240
GCGAGACATC TTTACTTTGA CTACTGGGGC CAGGGAACCC AGGTC      285
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:383:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 300 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:383:

ES 2 345 580 T3

	TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCGTGA TACAGCTTTC CCATCTACTG GATCGGCTGG	60
	GTGCCCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGCATGSSGA TCATCTATCC TGGTACTCT	120
5	GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCOAAGGC CAGSTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC	180
	AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT	240
10	CGGAGAGTGG TTCGGGCAIT TATTATTTAC TTTGACTACT GGGGCCAGGG AACCCCTGGTC	300

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:384:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 287 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 20 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:384:

	TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCGTGA TACAGCTTAA CCAGTTATG GATCGGCTGG	60
	GTGCCCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGCATGSSGA TCATCTATCC TGGTACTCT	120
30	GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCOAAGGC CAGSTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC	180
	AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT	240
35	CGGAGACAAA GGGTACTTT GACTACTGG GCCAGGGAAC CCTGCTC	287

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:385:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 288 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 45 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:385:

	TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCGTGA TACAGCTTAA CCAGTTACTG GATCGGCTGG	60
	GTGCCCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG TGCATGSSGA TCATCTATCC TGGTACTCT	120
55	GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCOAAGGC CAGSTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC	180
	AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT	240
60	CGGAGGGGAT CGTGGTACTT TGACTACTGG GGCAGGGAA CCTGCTC	288

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:386:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 294 pares de bases

ES 2 345 580 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:386:

10 TCTCTGAAGA TCTCTGTAA GGGTCTGGA TACAACCTTA CCACCTACTG GATCGGCTGG 60
GTGGCCAGA TGCCCGGGA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCATCTATCC TGCTGACTCT 120
GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCGTC 180
15 AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
GCGGACTCC CCACTGACAG TTGGTTCGAC CCTGGGGCC AGGGAACCT GGTG 294

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:387:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

25

(A) LONGITUD: 312 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:387:

35 TCTCTGAAGA TCTCTGTAA GGGTCTGGA TACAACCTTA CCACCTACTG GATCGGCTGG 60
GTGGCCAGA TGCCCGGGA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCATCTAICC TGGTACTCT 120
GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC 180
40 AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTGG ACACCGCCAT GTATTACTGT 240
GCGGACTCC CCACTGACAG TTGGTTCGAC CCTGGGGCC AGGGAACCT GGTG 300
45 GGAACTCTGG TC 312

50

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:388:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 312 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

55

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

60

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:388:

65

ES 2 345 580 T3

	TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTCTGGG TACAACCTTA TCACCTACTG GATCGGCTGG	60
5	GTGCGCCAGA TACCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTGA CTCT	120
	GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC	180
	AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT	240
10	GCGAGACATG AGCAGCTGGT ACAGGGTTAC TACTACTACG GTATGGACGT CTGGGGCCAA	300
	GGGACCACGG TC	312

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:389:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 309 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:389:

	TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTCTGGG TACAACCTTA TCACCTACTG GATCGGCTGG	60
30	GTGCGCCAGA TACCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTGA CTCT	120
	GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC	180
35	AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT	240
	GCGAGACATG AGCAGCTGGT ACAGGGTTAC TACTACTACG GTATGGACGT CTGGGGCCAA	300
40	ACCAACGGTC	309

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:390:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 294 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:390:

	TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTCTGGG TACAACCTTA TCACCTACTG GATCGGCTGG	60
60	GTGCGCCAGA TACCCGGGAA AGGCCTGGAG TGGATGGGGA TCATCTATCC TGGTGA CTCT	120
	GATACCAGAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAAGTCCATC	180
65	AGCACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCTCGG ACACCGCCAT GTATTACTGT	240
	GCGAGACACC ACGACTACTA CCGTATGGAC GTCTGGGGCC AAGGGACCAC GGTC	294

ES 2 345 580 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:391:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 288 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:391:

5	TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTCTGGA TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGGCTGG	60
10	GTGCGCCAGA TGCCCGGGA AGGCCTGGAG TGGATGGGA TCACCTTTC TGGTACTCT	120
15	GATACCAGAT ACAGCCCGCC CTTCCTAGGC CAGGTCACCA TCTCAGCCGA CAGTCCATC	180
20	AACACCGCCT ACCTGCAGTG GAGCAGCCTG AAGGCCCTGG ACACCCCAT GTATTACTGT	240
25	GCGAGCGCT ACTACGGTAT GGACGTCTGG GGCCAGGGGA CCACGGTC	288

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:392:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 246 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:392:

30	TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA BTAGCTATGC TATGCACTGG	60
35	GTCCGCCAGG CTCCAGGCAA GGGGCTGGAG TGGGTGGCAG TTATATCATA TGATGGAAGC	120
40	AATAAATACT ACGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTACCA TCTCCAGAGA CAATTCCAAG	180
45	AACACGCTGT ATCTGCRAAT GAACAGCCTG AGAGCTGAGG ACACGGCTGT GTATTACTGT	240
50	GCGAGA	246

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:393:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 294 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:393:

ES 2 345 580 T3

TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA GTAGCTATGC TATGCACTGG 60
 GTCCGCCAGG CTCCAGGCAA GGGGCTGGAC TGGGTGGCAG TTATATCATA TGATGGAACC 120
 5 AATAAATACG ACGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTACCA TCTCCAGAGA CAATTCCAAG 180
 AACACGCTGT ATCTGCAAAT GAACAGCCTG AGATCTGAGG ACACGGCTGT GTATTACTGT 240
 10 GCGAGAGAGT CTCCGGCTG GACTTGGAT TTCTGGGGCC GTGGCACCCCT GGTC 294

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:394:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 294 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 20 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:394:

TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA GTAGCTATGC TATGCACTGG 60
 GTCCGCCAGG CTCCAGGCAA GGGGCTGGAC TGGGTGGCAG TTATATCATA TGATGGAACC 120
 30 AATAAATACG ACGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTACCA TCTCCAGAGA CAATTCCAAG 180
 AACACGCTGT ATCTGCAAAT GAACAGCCTG AGATCTGAGG ACACGGCTGT GTATTACTGT 240
 35 GCGAGGAAGT CTCCGGCTG GACTTGGAT TTCTGGGGCC GTGGCACCCCT GGTC 294

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:395:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 294 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 45 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:395:

TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA ATAAGTGTAC TATCACTGG 60
 GTCCGCCAGG CTCCAGGCAA GGGGCTGGAC TGGGTGGCAG TTATATCATA TGATGGAGCC 120
 55 AATAAATACG ACGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTACCA TCTCCAGAGA CAATTCCAAG 180
 AACACGCTGT ATCTGCAAAT GAACAGCCTG AGATCTGAGG ACACGGCTGT GTATTACTGT 240
 60 GCGAGAGAGT CTCCGGCTG GACTTGGAT TTCTGGGGCC GTGGCACCCCT GGTC 294

65 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:396:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

ES 2 345 580 T3

(A) LONGITUD: 294 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:396:

```
5
10 TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA ATAACIGTAC TATACACTGG      60
    GTCCGCCAGG CCCCAGGCPA GGGGCTGGAC TGGGTGGCAG TTATATCATA TGATGGAGCC      120
15 AATBAATACG ACGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTCACCA TCTCCAGAGA CAATTCCAAG      180
    AACACGCTGT ATCTGCBAAT GAACAGCCTG AGATCTGAGG ACACGGCTGT GTATTACTGT      240
20 GCGAGCGAGT CCTCCGGCTC TACTTCGAT CTCTGGGGCC GTGGCACCCCT GGTC          294
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:397:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 294 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:397:

```
25
30 TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA GTAGCTATGC TATGCACTGG      60
    GTCCGCCAGG CTCCAGGCCA GGGGCTGGAC TGGGTGGCPA TTATGTCTCA TGATGCARCC      120
35 AATAAATTCC ACGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTCACCA TCTCCAGAGA CAATTCCAAG      180
    AACACGCTGT ATCTGCAAAF GAACAGCCTG AGATCTGAGG ACACGGCTGT GTATTACTCT      240
40 GCGAGAGAGT CTTCGGGCTC TACTTCGAT CTCTGGGGCC GTGGCACCCCT GGTC          294
45
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:398:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 294 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:398:

65

ES 2 345 580 T3

TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA ATAACTGPAO TCTACACTGG 60
 GTCCGCCAGG CTCCAGGCAA GGGGCTGGAC TGGGTGCAG TTTATCATA TGATGGAGCC 120
 5 AATAAATACG ACGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTCACCA TCTCCAGAGA CAATTCCAAG 180
 AACACGCTGT ATCTGCAAAT GAACAGCCTG AGATCTGAGG ACACGGCTGT GTATTACTGT 240
 10 GCGAGAGAGT CTTCCGGCTG GTACTTCGAT CTCTGGGGCC GTGGCACCCCT GGTG 294

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:399:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 294 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 20 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:399:

TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA GTAGCTATGC TATGCACTGG 60
 GTCCGCCAGG CTCCAGGCAA GGGGCTGGAC TGGGTGGCAG TTTTTCATA TGATGGAGCC 120
 30 AATAAATACG ACGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTCACCA TCTCCAGAGA CAATTCCAAG 180
 AACACGCTGT ATCTGCAAAT GAACAGCCTG AGATCTGAGG ACACGGCTGT TTATTACTGT 240
 35 GCGAGAGAGT CTTCCGGCTG GTACTTCGAT TTCTGGGGCC GTGGCACCCCT GGTG 294

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:400:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 294 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 45 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:400:

TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA GTAACATAC TATGCACTGG 60
 GTCCGCCAGG CTCCAGGCAA GGGGCTGGAC TGGGTGGCAG TTTTTCATA TGATGGAGCC 120
 55 AATAAATACG ACGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTCACCA TCTCCAGAGA CAATTCCAAG 180
 AACACGCTGT ATCTGCAAAT GAACAGCCTG AGATCTGAGG ACACGGCTGT TTATTACTGT 240
 60 GCGAGAGAGT CTTCCGGCTG GTACTTCGAT TTCTGGGGCC GTGGCACCCCT GGTG 294

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:401:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 294 pares de bases

ES 2 345 580 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:401:

```
10 TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA ATAACTGTAC TATACTACTGG 60
    GTCGCCCAGG CTCCAGGCAA GGGGCTGGAC TGGGTGGCAG TTATATCATA TGATGGAGCC 120
15 AATAAATAAG ACGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTCACCA TCTCCAGAGA CAATCCAAG 180
    AACACGCTGT ATCTGCAART GAGCAGCCTG AGATCTGAAG ACACGGCTGT ATATTACTGT 240
20 GCGAGAGAGT CCTCCGGCTG GACTTTCGAT CTCTGGGGCC GTGGCAACCCT GGTG 294
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:402:

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 294 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

30

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:402:

35

```
TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA GTAGCTATGC TATGCACTGG 60
    GTCGCCCAGG CTCCAGGCAA GGGGCTGGAG TGGGTGGCAG TTATATCATA TGATGGAAGC 120
40 AATAAATACT ACGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTCACCA TCTCCAGAGA CAATCCAAG 180
    AACACGCTGT ATCTGCAART GAGCAGCCTG AGATCTGAGG ACACGGCTGT ATATTACTGT 240
45 GCGAGAGGAT GGTTCGGGGA GTTATGGGAC TACTGGGGCC AGGGAACCCT GGTG 294
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:403:

50

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 297 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

55

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

60

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:403:

65

ES 2 345 580 T3

	TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA GCAGCTATGC TATGCACTGG	60
5	GTCCGCCAGG CTCCAGGCAA GGGGCTGGAG TGGGTGGCAG TTATATCATA TGATGGAAGC	120
	AATAAATACT ACGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTCACCA TCTCCAGAGA CAATTCCAAG	180
	AACACGCTGT ATCTGCAAAAT GAACAGCCTG GGAGCTGAGG ACACGGCTGT GTATTACTGT	240
10	GCGAGAGAGA GTCTCTTAAC TGGGGACTTT GACTACTGGG GCCAGGGAAC CCTGGTC	297

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:404:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 312 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 20 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:404:

	TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA GTAGCTATCC TATGCACTGG	60
30	GTCCGCCAGG CTCCAGGCAA GGGGCTGGAG TGGGTGGCAG TTATATCATA TGATGGAAGC	120
	AATAAATACT ACGCAGACTC CGTGAAGGGT CGATTCACCA TCTCCAGAGA CAACTCCAAG	180
	AACACGCTGT ATCTGCAAAAT GAACAGCCTG AGAGCTGAGG ACACGGCTGT GTATTACTGT	240
35	GCGAGAGGGT ACGATATTTT GACTGGTTAT TATGACCCGC TCTTTGACAA CTGGGGCCAG	300
	GGAACCTGG TC	312
40		

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:405:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 312 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - 50 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:405:

	TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA GTAGCTATAC TATGCACTGG	60
55	GTCCGCCAGG CTCCAGGCAA GGGGCTGGAG TGGGTGGCAG TTATATCATA TGATGGAAGC	120
	AATAAATACT ACGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTCACCA TCTCCAGAGA CAATTCCAAG	180
60	AACACGCTGT ATCTGCAAAAT GAACAGCCTG AGAGCTGAGG ACACGGCTGT GTATTACTGT	240
	GCGAGAGGGT ACGATATTTT GACTGGTTAT TATGACCCGC TCTTTGACAA CTGGGGCCAG	300
65	GGAACCTGG TC	312

ES 2 345 580 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:406:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 312 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:406:

```
15   TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA GTAGCTATGC TATGCACTGG      60
    GTCCGCCAGG CTCCAGGCCA GGGCTGGAG TGGGTGGCAG TTATATCATA TGATGGGAGC      120
20   AATAAATACT ACGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTACCCA TCTCCAGAGA CATTCCPAG      180
    AACACGCTGT ATCTGCAAT GACAGCCTG AGAGCTGAGG ACACGGCTGT GTATTACTGT      240

    GCGAGAGATC AGGCGGCGTA TAGTGGCTAC GGTGGGGG GTATGGACGT CTGGGGCCAA      300
30   GGGACCACGG TC                                                                312
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:407:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 312 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:407:

```
35   TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA GTAGCTATAC TATGCACTGG      60
    GTCCGCCAGG CTCCAGGCCA GGGCTGGAG TGGGTGGCAG TTATATCATA TGATGGGAGC      120
40   AATAAATACT ACGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTACCCA TCTCCAGAGA CATTCCPAG      180
    AACACGCTGT ATCTGCAAT GACAGCCTG AGAGCTGAGG ACACGGCTGT GTATTACTGT      240
55   GCGAGCCATT ACTATGGTTC GGGGAGTTAT AGCTACTACG GTATGGACGT CTGGGGCCAA      300
    GGGACCACGG TC                                                                312
60
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:408:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 312 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 345 580 T3

- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:408:

```
5
10
15
20
TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA GTAGCTATAC TATGCACTGG      60
GTCCGGCCAGG CTCCAAGCAA GGGGCTGGGG TGGGTGGCAG TTATATCATA TGATGGGAGC      120
AATAAATACT ACGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTACCCA TCTCCAGAGA CAATTCCAAG      180
AACACGCTGT ATCTGCBAAT GAACAGCCTG AGAGCTGAGG ACACGGCTGT GTATTACTGT      240
GCGAGCCATT ACTATGGTTC GGGGAGTTAT AGCTACTACG GTATGGACGT CTGGGGCCAA      300
GGGACCACGG TC                                                                    312
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:409:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 306 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:409:

```
25
30
35
40
45
50
TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA GTAGCTATGC TATGCACTGG      60
GTCCGGCCAGG CTCCAGGCAA GGGGCTGGAG TGGGTGGCAG TTATATTTCA TGACCAAASC      120
AATAAATACT ACGCAGACTC CGTGAAGGGC CGAATCACCA TCTCCAGAGA CAATTCCAAG      180
AACACGCTGT ATCTGCBAAT GAACAGCCTG AGAGCTGAGG ACACGGCTGT GTATTACTGT      240
GCGAGAGAGG GGACTACGTA CTACTACTAC TACGGTATGG ACCCTGGGG CCAGGSGACC      300
ACGGTC                                                                    306
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:410:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 246 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:410:

65

ES 2 345 580 T3

	TCGGTGAAGG TCTCCTGCAA GGCTTCTGGA GGCACCTTCA GCACCTATGC TATCAGCTGG	60
	GTGGGACAGG CCCCTGGACA AGGGCTTGAG TGGATGGGAA GGATCATCCC TATCCTTGGT	120
5	ATAGCAAAC TACCCACAGAA GTTCCAGGGC AGAGTCACGA TTACCGCGGA CAAATCCAGC	180
	AGCACAGCCT ACATGGAGCT GAGCAGCCTG AGATCTGAGG ACACGGCCGT GTATTACTGT	240
10	GCGAGA	246

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:411:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 300 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 20 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- 25 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:411:

	TCGGTGAAGG TCTCCTGCAA GGCTTCTGGA GGCACCTTCA GCACCTATGC TATCAGCTGG	60
	GTGGGACAGG CCCCTGGACA AGGGCTTGAG TGGATGGGAA GGATCATCCC TATCCTTGGT	120
30	ATAGCAAAC TACCCACAGAA GTTCCAGGGC AGAGTCACGA TTACCGCGGA CAAATCCAGC	180
	AGCACAGCCT ACATGGAGCT GAGCAGCCTG AGATCTGAGG ACACGGCCGT GTATTACTGT	240
35	GCGAGAGACG AGACTGGGGA TCTCGGTGCT TTTGATATCT GGGGCCAAGG GACAATGGTC	300

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:412:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 243 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 45 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:412:

	ACCTGTCCC TCACCTGCGC TGTCTATGGT GGGTCCITCA GTGGTTACTA CTGGAGCTGG	60
	ATCCGCCAGC CCCAGGGAA GGGCTGGAG TGGATTGGGG AAATCAATCA TAGTGAAGC	120
55	ACCAACTACA ACCCGTCCCT CAGAGTCGA GTCAACATAT CAGTAGACAC GTCCAAGAAC	180
	CAGTCTCCC TGAGCTGAG CTCTGTGACC GCGCGGACA CGGCTGTGTA TTACTGTGCG	240
60	AGA	243

65 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:413:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

ES 2 345 580 T3

(A) LONGITUD: 282 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:413:

```
ACCCTGTCCC TCACCTGCGC TGTCTATGGT GGTCCCTTCA GTGGTTACTA CTGGAGCTGG      60
ATCCGCCAGC CCCCAGGGAA GGGGCTGGAG TGGATTGGGG AAATCAATCA TAGTGGAGC      120
ACCAACTACA ACCCGTCCCT CAAGACTCGA GTCACCATAT CAGTAGACAC GTCCAAGAAC      180
CAGTTCTCCC TGAAGCTGAG CTCTGTGACC GCCCGGGACA CGGCTGTGTA TTACTGTGGC      240
AGGAACTIAT TTTTGGACTA CIGGGGCCAG GGAACCOCTGG TC                          282
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:414:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 285 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:414:

```
ACCCTGTCCC TCACCTGCGC TGTCTATGGT GGTCCCTTCA GTGGTTACTA CTGGAGCTGG      60
ATCCGCCAGC CCCCAGGGAA GGGGCTGGAG TGGATTGGGG AAATCAATCA TAGTGGAGC      120
ACCAACTACA ACCCGTCCCT CAAGACTCGA GTCACCATAT CAGTAGACAC GTCCAAGAAC      180
CAGTTCTCCC TGAAGCTGAG CTCTGTGACC GCCCGGGACA CGGCTGTGTA TTACTGTGGC      240
AGGSCAGCTA ACTGCTTTGA CTACTGGGGC CAGGSAACCC TGGTC                          285
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:415:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 297 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:415:

ES 2 345 580 T3

ACCCCTGTCCTC TCACCTGCGC TGTCIAIGGI GGGTCCTTCA GTGGTTACTA CTGGAGCTGG 60
ATCCGCCCAGC CCCGAGGGAA GGGGCTGGAG TGGATTGGGG AATCAATCA TAGTGGGAGC 120
5 ACCAACTACA ACCCGTCCCT CAAGAGTCGA GTCACCATAT CAGTAGACAC GTCCAGAAC 180
CAGTTCCTCC TGAAGCTGAG CTCTGTGACC GCGCCGGACA CGGCTGTCTA TTAGTGTGCA 240
10 GAGAGTGAGG GATGGGGATG GGACTACTTT GACTACTGGG GCCAGGGGAC CCTGGTC 297

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:416:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 3122 pares de bases

20 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:416:

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 345 580 T3

	AATTAGCGGC CGCTGTGAC AAGCTTCGAA TTCAGTATCS ATGTGGTACC TGGATCCCTCG	60
5	AGTGCSSCCG CAGTATGCAA AAAAAAGCCC GCTCATTAGG CCGSCTCTTG GCAGAACATA	120
	TGCATCGCGT CCSCCATCTC CAGCAGCCGC ACCGGGGCGA TCTGGGGCAG CGTTGGGTCC	180
	TGGCCACGGG TGGGCATGAT CSTGCTCCTG TCGTTGAGCA CCCGGGTAGG CTGGCCGGGT	240
10	TGCCTTACTG GTTAGCA3AA TGAATCACCG ATACGGGAGC GAAOGTGAAG CGACTGCTGC	300
	TGCAAAACGT CTGGGACCTS AGCAACAACA TGAATGGTCT TCGGTTTCCG TGTTTCGTAA	360
15	AGTCTGGAAA CCGGGAAGTC AGGSCCCTGC ACCATTATGT TCCGGATCTG CATCCGASSA	420
	TGCTSCTGGC TACCCTGTGS AACACCTACA TCTSTATTA ACGAGCGCTS GCATTGACCC	480
	TGAGTGATTT TTCTCTGGTC CCGCCGCATC CATACCGCCA GTTGTTTACC CTCACAAGCT	540
20	TCCASTAACC GGGCATGTTT ATCATCAGTA ACCCGTATCG TGAGCATCCT CTCTCSTTTC	600
	ATCGGTATCA TTACCCCAT GAACAGAAAT TCCCCCTTAC ACGGAGGCAT CAGGTGACCA	660
25	AACAGGAAA AACCGCCCTT AACATGGCCC GCTTTATCAG AAGCCASACA TTACCGCTTC	720
	TGGAGAAACT CAACGAGCTG GACGGGATG AACAGGCAGA CATCTGTGAA TCGTTTACG	780
30	ACCACGCTGA TGAGCTTAC CGCAGCTGCC TCGCGCGTTT CCGTGATGAC GGTGAAAACC	840
	TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGSTCA CAGCTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA	900
	GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGGCGA GCCATGACCC	960
35	AGTCACGTAG CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAAGTAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT	1020
	ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TGCGTAAGGA GAAAATACCG	1080
40	CATCAGGC5C TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTS CGCTCGGTGG TTGGGCTGG	1140
	GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAG3CGGT APTACGGTTA TCCACAGAAAT CAGGGGATAA	1200
45	CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA ABAAGGCCGC	1260
	GTTCCTGCCG TTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG CATCACAAA ATCGACGCTC	1320
	AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACGGACT AFAAGATAC CAGGCSTTC CCCCTGGAAG	1380
50	CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCT GCCGTTACC GSATACCTGT CCGCCTTTCT	1440
	CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTCTCATAG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA	1500
55	GGTCGTTCCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CAAACCCCGG GTTCAGCCCG ACCGCTCCGC	1560
	CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC	1620
60	AGCAGCCAGG CGCGCCTTGG CCTAAGAGGC CACTGGTAAC AGGATTAGCA GACCGASGTA	1680
	TGTAGCCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGUCTAAC TACGGCTACA CTAGAAAGAC	1740
65	ACTATTTGGT ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAPAAGAG TTGGTAGCTC	1800

ES 2 345 580 T3

	TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTTCCA AGCAGCAGAT	1860
5	TACGCGCAGA AAAAAAGSAT CTCAGAAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG GGTCTGACGC	1920
	TCAGTGGAAC GAAAACCTCAC GTTACGGGAT TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT	1980
	CACCTAGATC CTTTTAAATT AAAATGAGC TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATCAGTA	2040
10	AACTTGGTCT GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT	2100
	ATTTCTGTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCTGTAG ATAACTACGA TACGGGAGGG	2160
15	CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCCGGAGAC CCACGCTCAC CGGCTCCAGA	2220
	TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAG GCGCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT	2280
20	ATCCGCCCTC ATCCAGTCTA TTAATTGTTG CCGGGAGGCT AGAGTAAGTA GTTGGCCAGT	2340
	TAATAGTTTG CGCAACGTTG TTGCCATTCG TGCAGGCTTC GTGGTGTAC GCTCGTCTTT	2400
	TGGTATGGCT TCATTCAGCT CCGGTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT GATCCCCCAT	2460
25	GTTGTCAAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC GTTGTGAGAA GTAAGTGGC	2520
	CGCAGTGTTA TCACICATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC	2580
30	CGTACAGTGC TTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCAAACAAG TCATTCAGC AATAGTGTAT	2640
	GCGGCGACCG AGTTGCTCTT GCGCGGCGTC AACACGGGAT AATACCGCGC CACATACCAG	2700
35	AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACICT CAAGGATCTT	2760
	ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTTACGCATC	2820
	TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAAACAGGA AGGCFAAATG CCGCAAAAAA	2880
40	GGGAATAAGG GCGACACGGA AATGTTGAAT AUTCATACTC TTCCTTTTTC AATATTATG	2940
	AAGCATTAT CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGATGTA TTTAGAAAAA	3000
45	TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGAGG TCTAGAAAC	3060
	CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCATATC ACGAGGCCCT TTCCTCTTCA	3120
	AG	3122

50

55

60

65