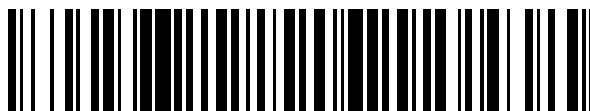


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 186**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2012** **PCT/US2012/069981**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013** **WO13096142**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2012** **E 12809955 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019** **EP 2793567**

54 Título: **Ratones con cadenas ligeras humanizadas**

30 Prioridad:

20.12.2011 US 201161578097 P

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

18.07.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MACDONALD, LYNN;
GURER, CAGAN;
HOSIAWA, KAROLINA, A.;
STEVENS, SEAN y
MURPHY, ANDREW, J.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 720 186 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ratones con cadenas ligeras humanizadas

5 Campo de la invención

Se describen ratones fértiles modificados genéticamente que expresan secuencias variables de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana afines con secuencias variables de cadena pesada humana. Se describen ratones, células, embriones y tejidos modificados genéticamente que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un ADAM6a funcional en un locus de ADAM6 de ratón, en donde los ratones, las células, los embriones y los tejidos comprenden segmentos génicos de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana que son capaces de reordenarse para formar un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina funcional. Las modificaciones incluyen loci de inmunoglobulina humana y/o humanizada. Se describen ratones que comprenden función de ADAM6, incluyendo ratones que comprenden una secuencia de ácido nucleico ectópica que codifica una proteína ADAM6. Se describen ratones macho modificados genéticamente que comprenden una modificación genética de un locus de región V_H de inmunoglobulina de ratón endógena, y que comprenden además actividad ADAM6, incluyendo ratones que comprenden una secuencia de ácido nucleico ectópica que restaura fertilidad al ratón macho.

Se describen ratones fértiles modificados genéticamente que comprenden una supresión o una modificación de un gen de ADAM6 endógeno u homólogo u ortólogo del mismo, y que comprenden una modificación genética que restaura la función de ADAM6 (u homólogo u ortólogo de la misma) totalmente o en parte, en donde los ratones expresan una secuencia variable λ de inmunoglobulina humana en el contexto de una secuencia constante de cadena ligera κ .

Antecedentes

Las aplicaciones farmacéuticas para anticuerpos en las últimas dos décadas han impulsado una gran cantidad de investigación acerca de la realización de anticuerpos que sean adecuados para su uso como productos terapéuticos humanos. Los productos terapéuticos de anticuerpos tempranos, basados en anticuerpos de ratón, no eran ideales como productos terapéuticos humanos debido a que la administración repetida de anticuerpos de ratón a seres humanos da como resultado problemas de inmunogenicidad que pueden frustrar los regímenes de tratamiento a largo plazo. Se han desarrollado soluciones basadas en la humanización de anticuerpos de ratón para hacerlos tener apariencia más humana y menos de tipo ratón. Esto se siguió de métodos para expresar secuencias de inmunoglobulina humana para su uso en anticuerpos, principalmente basándose en la expresión *in vitro* de bibliotecas de inmunoglobulina humana en fagos, bacterias o levadura. Finalmente, se realizaron intentos de preparar anticuerpos humanos útiles a partir de linfocitos humanos *in vitro*, en ratones injertados con células hematopoyéticas humanas, y en ratones transgénicos o transgénicos con loci de inmunoglobulina endógena inactivados. En los ratones transgénicos, fue necesario inactivar los genes de inmunoglobulina de ratón endógenos de modo que los transgenes completamente humanos integrados aleatoriamente actuarían como la fuente de secuencias de inmunoglobulina expresadas en el ratón. Dichos ratones pueden realizar anticuerpos humanos adecuados para su uso como productos terapéuticos humanos, pero estos ratones presentan problemas sustanciales con sus sistemas inmunitarios. Estos problemas (1) hacen a los ratones poco prácticos para generar un repertorio de anticuerpos suficientemente diverso, (2) requieren el uso de arreglos de nueva ingeniería genética extensivos, (3) proporcionan un proceso de selección clonal subóptimo probablemente debido a la incompatibilidad entre elementos humanos y de ratón, y (4) hacen a estos ratones una fuente poco fiable de poblaciones grandes y diversas de secuencias variables humanas necesarias para ser verdaderamente útiles para preparar productos terapéuticos humanos.

Los ratones transgénicos que contienen transgenes de anticuerpos completamente humanos contienen transgenes insertados de forma aleatoria que contienen secuencias variables de cadena pesada de inmunoglobulina humana no reordenadas (secuencias V, D y J) ligadas a secuencias constantes de cadena pesada humana, y secuencias variables de cadena ligera de inmunoglobulina humana no reordenadas (V y J) ligadas a secuencias constantes de cadena ligera humana. Los ratones generan por lo tanto genes de anticuerpos reordenados de loci distintos de loci de ratón endógenos, donde los genes de anticuerpos reordenados son completamente humanos. En general, los ratones contienen secuencias de cadena pesada humana y secuencias de cadena ligera κ humana, aunque también se ha informado de ratones con al menos algunas secuencias λ humanas. Los ratones transgénicos en general tienen loci de inmunoglobulina endógenos dañados y no funcionales, o desactivaciones de loci de inmunoglobulina endógenos, de modo que los ratones sean incapaces de reordenar secuencias de anticuerpos humanos en un locus de inmunoglobulina de ratón endógeno. Las fluctuaciones de dichos ratones transgénicos los hace insatisfactorios para generar un repertorio de anticuerpos humanos suficientemente diverso en ratones, probablemente debido al menos en parte a un proceso de selección clonal subóptimo que interacciona con moléculas de anticuerpos completamente humanas en un sistema de selección de ratón endógeno.

Sigue existiendo la necesidad en la técnica de preparar ratones modificados genéticamente mejorados que sean útiles en la generación de secuencias de inmunoglobulina, incluyendo secuencias de anticuerpos humanos, y que sean útiles en la generación de un repertorio de anticuerpos humanos suficientemente diverso. Sigue existiendo también una necesidad de ratones que sean capaces de reordenar segmentos génicos de inmunoglobulina para formar genes de inmunoglobulina reordenados útiles, incluyendo dominios variables de cadena pesada humana que sean afines

con dominios variables λ humano o κ humano, o que sean capaces de realizar proteínas a partir de loci de inmunoglobulina alterados, incluyendo loci que contienen una selección suficientemente diversa de secuencias variables de cadena ligera λ humana y/o κ humana. Sigue existiendo la necesidad de ratones que puedan generar regiones variables de anticuerpos a partir de segmentos tanto κ humanos como λ humanos, en donde los segmentos κ humanos y λ humanos son afines con dominios variables de cadena pesada humana. También existe la necesidad de un uso aumentado en ratones modificados genéticamente de secuencias λ humanas.

Sumario de la invención

Se describen ratones modificados genéticamente que comprenden una modificación que elimina la actividad de un gen de ADAM6 endógeno, en donde la modificación da como resultado una pérdida de fertilidad, y los ratones comprenden además una secuencia que codifica una actividad que complementa o rescata la actividad de ADAM6 perdida o reducida (o actividad homóloga u ortóloga), y los ratones comprenden además modificaciones que los permiten expresar regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina humana que son afines con regiones variables de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana. Por lo tanto, se proporciona un ratón que comprende (a) uno o más segmentos génicos $V\lambda$ humanos no reordenados y uno o más segmentos génicos $J\lambda$ humanos no reordenados en un locus de cadena ligera kappa de inmunoglobulina endógeno del ratón, en donde el locus de cadena ligera kappa de inmunoglobulina comprende una región $C\kappa$ de ratón; (b) uno o más segmentos génicos de V_H humanos, uno o más segmentos génicos D_H humanos y uno o más segmentos génicos J_H humanos en un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno del ratón; y (c) una modificación de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina, en donde la modificación elimina la función de ADAM6 endógena, que está asociada con una reducción de la fertilidad en ratones macho, comprendiendo además el ratón una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6a de ratón o un ortólogo u homólogo o fragmento funcional de la misma, cada uno de los cuales es funcional para mejorar o restaurar dicha reducción de la fertilidad en un ratón macho, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6b de ratón, o un ortólogo u homólogo o fragmento funcional de la misma, cada uno de los cuales es funcional para mejorar o restaurar dicha reducción de la fertilidad en un ratón macho, en donde las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas ADAM6, ortólogos, homólogos o fragmentos funcionales de las mismas están presentes en los segmentos génicos de cadena pesada humana. Las regiones variables de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana se expresan fusionadas con regiones constantes κ de ratón.

En diversos aspectos, la secuencia que codifica la actividad de ADAM6 es contigua con una secuencia de inmunoglobulina humana. En diversos aspectos, la secuencia que codifica actividad de ADAM6 es contigua con una secuencia de inmunoglobulina no humana. La secuencia está presente en el mismo cromosoma que el locus de cadena pesada de inmunoglobulina no humana endógeno del ratón, presente en los segmentos génicos de cadena pesada humana.

Se describen ratones modificados genéticamente que comprenden una modificación que mantiene la actividad de un gen de ADAM6 u homólogo u ortólogo del mismo, en donde la modificación incluye inserción de uno o más segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina humana cadena arriba de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina no humana, y los ratones comprenden además modificaciones que les permiten expresar regiones variables de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana afines con regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina humana. Las regiones variables de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana se expresan fusionadas con regiones constantes κ de ratón.

Las alteraciones, supresiones y/o modificaciones de silenciamiento funcional ilustrativas incluyen cualquier modificación que dé como resultado una eliminación de la actividad de la proteína o proteínas ADAM6 codificadas por el gen o genes de ADAM6 del ratón.

También se desvelan construcciones de ácido nucleico, células, embriones, ratones y métodos para preparar ratones que comprenden una modificación que da como resultado una proteína ADAM6 o un gen de ADAM6 de ratón endógenos no funcionales (por ejemplo, una desactivación de o una supresión en un gen de ADAM6 endógeno), en donde los ratones comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6 u ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho.

También se desvelan construcciones de ácido nucleico, células, embriones, ratones y métodos para preparar ratones que comprenden una modificación de un locus de inmunoglobulina de ratón endógeno, en donde los ratones comprenden una proteína ADAM6 u ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho. El locus de inmunoglobulina de ratón endógeno es un locus de cadena pesada de inmunoglobulina, y la modificación elimina la actividad de ADAM6 de una célula o tejido de un ratón macho.

También se desvelan ratones que comprenden una secuencia de nucleótidos ectópica que codifica un ADAM6 de ratón u ortólogo u homólogo o fragmento funcional del mismo; también se desvelan ratones que comprenden una secuencia de nucleótidos endógena que codifica un ADAM6 de ratón u ortólogo u homólogo o fragmento del mismo, y al menos una modificación genética de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada.

También se desvelan métodos para preparar ratones que comprenden una modificación de un locus de

inmunoglobulina de ratón endógeno, en donde los ratones comprenden una proteína ADAM6 u ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho.

También se desvelan métodos para preparar ratones que comprenden una modificación genética de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada, en donde la aplicación de los métodos da como resultado ratones macho que comprenden un locus de inmunoglobulina de cadena pesada modificado (o una supresión del mismo), y los ratones macho son capaces de generar descendencia por apareamiento. En un caso, los ratones macho son capaces de producir espermatozoides que pueden viajar desde un útero de ratón a través de un oviducto de ratón para fertilizar un óvulo de ratón.

También se desvelan métodos para preparar ratones que comprenden una modificación genética de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina y un locus de cadena ligera de inmunoglobulina, en donde la aplicación de los métodos para modificar el locus de cadena pesada da como resultado ratones macho que muestran una reducción de la fertilidad, y los ratones comprenden una modificación genética que restaura totalmente o en parte la reducción de la fertilidad. En diversas realizaciones, la reducción de la fertilidad se caracteriza por una incapacidad del espermatozoide de los ratones macho para migrar desde un útero de ratón a través de un oviducto de ratón para fertilizar un óvulo de ratón. En diversas realizaciones, la reducción de la fertilidad se caracteriza por espermatozoides que muestran un defecto de migración *in vivo*. En diversas realizaciones, la modificación genética que restaura totalmente o en parte la reducción de la fertilidad es una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen de ADAM6 de ratón u ortólogo u homólogo o fragmento del mismo que es funcional en un ratón macho.

En una realización, la modificación genética comprende reemplazar loci variables de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos con loci variables de cadena pesada de inmunoglobulina humana. En una realización, la modificación genética comprende inserción de loci variables de cadena pesada de inmunoglobulina humana en loci variables de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos. En una realización, la modificación genética comprende la supresión de un locus variable de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno totalmente o en parte, en donde la supresión da como resultado pérdida de función de ADAM6 endógena. En una realización específica, la pérdida de función de ADAM6 endógena está asociada con una reducción de la fertilidad en ratones macho.

También se desvela una modificación genética que comprende inactivación de un locus variable de cadena pesada de inmunoglobulina no humana endógeno totalmente o en parte, en donde la inactivación no da como resultado pérdida de la función de ADAM6 endógena. La inactivación puede incluir reemplazo o supresión de uno o más segmentos génicos de ratón endógenos que da como resultado un locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón endógeno que es sustancialmente incapaz de reordenación para codificar una cadena pesada de un anticuerpo que comprende segmentos génicos de ratón endógenos. La inactivación puede incluir otras modificaciones que hacen al locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno incapaz de reordenarse para codificar la cadena pesada de un anticuerpo, en donde la modificación no incluye reemplazo o supresión de segmentos génicos endógenos. Las modificaciones ejemplares incluyen inversiones y/o translocaciones cromosómicas mediadas por técnicas moleculares, por ejemplo, usando colocación precisa de sitios de recombinación específica (por ejemplo, tecnología Cre-lox). Otras modificaciones ilustrativas incluyen inactivar el enlace operativo entre los segmentos génicos variables de inmunoglobulina de ratón y las regiones constantes de inmunoglobulina no humana.

En una realización, la modificación genética comprende insertar en el genoma del ratón un fragmento de ADN que contiene uno o más segmentos génicos V_H humanos, uno o más segmentos génicos D_H humanos y uno o más segmentos génicos J_H humanos unidos operativamente con una o más secuencias de región constante (por ejemplo, un gen de IgM y/o IgG). En una realización, el fragmento de ADN es capaz de experimentar reordenación en el genoma del ratón para formar una secuencia que codifica un dominio variable de cadena pesada humano de un anticuerpo.

Se desvelan ratones que comprenden una modificación que reduce o elimina la expresión de ADAM6 de ratón a partir de un alelo de ADAM6 endógeno de modo que un ratón macho que tenga la modificación muestra una fertilidad reducida (por ejemplo, una capacidad altamente reducida de generar descendencia por apareamiento), o es esencialmente infértil, debido a la reducción o eliminación de la función de ADAM6 endógena, en donde los ratones comprenden además una secuencia de ADAM6 ectópica u homólogo u ortólogo o fragmento funcional de la misma. La modificación que reduce o elimina la expresión de ADAM6 de ratón puede ser una modificación (por ejemplo, una inserción, una supresión, un reemplazo, etc.) en un locus de inmunoglobulina de ratón.

Se desvela que la reducción o pérdida de la función de ADAM6 puede comprender una incapacidad o incapacidad sustancial del ratón para producir espermatozoides que puedan viajar desde un útero de ratón a través de un oviducto de ratón para fertilizar un óvulo de ratón. Al menos aproximadamente el 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las células espermáticas producidas en un volumen de eyaculación del ratón pueden ser incapaces de atravesar un oviducto *in vivo* después de la copulación y fertilizar un óvulo de ratón.

Se desvela que la reducción o pérdida de la función de ADAM6 comprende una incapacidad para formar o incapacidad sustancial para formar un complejo de ADAM2 y/o ADAM3 y/o ADAM6 en una superficie de una célula espermática del ratón. En una realización, la pérdida de función de ADAM6 comprende una incapacidad sustancial para fertilizar un óvulo de ratón por copulación con un ratón hembra.

También se desvela un ratón que carece de un gen de ADAM6 endógeno funcional y comprende una proteína (o una secuencia de nucleótidos ectópica que codifica una proteína) que confiere funcionalidad de ADAM6 al ratón. El ratón puede ser un ratón macho y la funcionalidad comprende fertilidad potencial en comparación con un ratón que carece de un gen de ADAM6 endógeno funcional.

La proteína está codificada por una secuencia genómica localizada en un locus de inmunoglobulina en la línea germinal del ratón. El locus de inmunoglobulina es un locus de cadena pesada. El locus de cadena pesada comprende al menos un segmento génico V_H humano, al menos un D_H humano y al menos un J_H humano.

En una realización, el ratón comprende una cadena ligera humana o quimérica humana/de ratón o quimérica humana/de rata (por ejemplo, variable humana, constante de ratón o de rata) y una cadena pesada quimérica variable humana/constante de ratón o rata. En una realización específica, el ratón comprende un transgén que comprende un gen de cadena ligera quimérica variable humana/constante de rata o ratón unido operativamente con un promotor transcripcionalmente activo, por ejemplo, al promotor ROSA26. En una realización específica adicional, el transgén de cadena ligera quimérico humano/de ratón o rata comprende una secuencia de región variable de cadena ligera humana reordenada en la línea germinal del ratón.

La secuencia de nucleótidos ectópica está localizada en un locus de inmunoglobulina en la línea germinal del ratón. El locus de inmunoglobulina es un locus de cadena pesada. El locus de cadena pesada comprende al menos un segmento génico V_H humano, al menos un D_H humano y al menos un J_H humano.

También se desvela un ratón que carece de un gen de ADAM6 endógeno funcional, en donde el ratón comprende una secuencia de nucleótidos ectópica que complementa la pérdida de función de ADAM6 de ratón. La secuencia de nucleótidos ectópica puede conferir al ratón la capacidad de producir descendencia que es comparable a un ratón de tipo silvestre correspondiente que contiene un gen de ADAM6 endógeno funcional. La secuencia puede conferir al ratón la capacidad de formar un complejo de ADAM2 y/o ADAM3 y/o ADAM6 en la superficie de células espermáticas del ratón. La secuencia puede conferir al ratón la capacidad de viajar desde un útero de ratón a través de un oviducto de ratón hasta un óvulo de ratón para fertilizar el óvulo.

[Eliminado]

[Eliminado]

En una realización, el ratón que carece del gen de ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia de nucleótidos ectópica produce un promedio de al menos aproximadamente 2 veces, 3 veces o 4 veces mayor número de crías por camada en un periodo de cría de 4 o 6 meses que un ratón que carece del gen de ADAM6 endógeno funcional y que carece de la secuencia de nucleótidos ectópica, y que se cría durante el mismo periodo de tiempo.

En una realización, el ratón que carece del gen de ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia de nucleótidos ectópica es un ratón macho, y el ratón macho produce espermatozoides que cuando se recuperan de los oviductos aproximadamente a las 5 a 6 horas después de la copulación reflejan una migración al oviducto que es al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos 80 veces, al menos 90 veces, 100 veces, 110 veces o 120 veces o más la de un ratón que carece del gen de ADAM6 endógeno funcional y que carece de la secuencia de nucleótidos ectópica.

En una realización, el ratón que carece del gen de ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia de nucleótidos ectópica cuando copula con un ratón hembra genera espermatozoides que son capaces de atravesar el útero y entrar y atravesar el oviducto en aproximadamente 6 horas a una eficacia que es aproximadamente igual al espermatozoide de un ratón de tipo silvestre.

En una realización, el ratón que carece del gen de ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia de nucleótidos ectópica produce aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces o aproximadamente 4 veces o más camadas en un periodo de tiempo comparable que un ratón que carece del gen de ADAM6 funcional y que carece de la secuencia de nucleótidos ectópica.

En un aspecto, el ratón proporcionado comprende, en su línea germinal, una secuencia de ácido nucleico distinta de ratón que codifica una proteína de inmunoglobulina proporcionada, en donde la secuencia de inmunoglobulina distinta de ratón comprende una inserción de un gen de ADAM6 de ratón u homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo. La secuencia de inmunoglobulina distinta de ratón comprende una secuencia de inmunoglobulina humana. La secuencia comprende uno o más segmentos génicos V humanos, uno o más segmentos génicos D humanos y uno o más segmentos génicos J humanos. En una realización, el o los segmentos génicos V, D y J no están reordenados. En una realización, el o los segmentos génicos V, D y J están reordenados. En una realización, después del reordenamiento del o los segmentos génicos V, D y J el ratón comprende en su genoma al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen de ADAM6 de ratón u homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo. En una realización, después del reordenamiento el ratón comprende en su genoma al menos dos secuencias de ácido

nucleico que codifican un gen de ADAM6 de ratón u homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo. En una realización, después del reordenamiento el ratón comprende en su genoma al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen de ADAM6 de ratón u homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo. En una realización, el ratón comprende el gen de ADAM6 u homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo en un linfocito B. En una realización, el ratón comprende el gen de ADAM6 u homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo en una célula distinta de linfocitos B.

En un aspecto, los ratones proporcionados expresan una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana o fragmento funcional de la misma de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón endógeno, en donde los ratones comprenden una actividad de ADAM6 que es funcional en un ratón macho.

[Eliminado]

También se desvelan ratones macho que comprenden una secuencia de ADAM6 de ratón ectópica u homólogo u ortólogo o fragmento funcional de la misma que codifica una proteína que confiere función de ADAM6.

En una realización, los ratones macho comprenden una secuencia de ADAM6 u homólogo u ortólogo o fragmento funcional de la misma en una localización en el genoma de ratón que se aproxima a la localización del alelo de ADAM6 de ratón endógeno, por ejemplo, 3' de una secuencia de segmento génico V y 5' de un segmento génico D inicial. En las realizaciones descritas en el presente documento la referencia a "ADAM6" significa "ADAM6 y ADAM6b".

Se desvelan ratones macho que comprenden una secuencia de ADAM6 u homólogo u ortólogo o fragmento funcional de la misma flanqueada cadena arriba, cadena abajo o cadena arriba y cadena abajo (con respecto a la dirección de transcripción de la secuencia de ADAM6) de una secuencia de ácido nucleico que codifica un segmento génico variable de inmunoglobulina. En una realización específica, el segmento génico variable de inmunoglobulina es un segmento génico humano. En una realización, el segmento génico variable de inmunoglobulina es un segmento génico humano, y la secuencia que codifica el ADAM6 de ratón u ortólogo u homólogo o fragmento del mismo funcional en un ratón está entre los segmentos génicos V humanos; en una realización, el ratón comprende dos o más segmentos génicos V humanos, y la secuencia está en una posición entre el segmento génico V final y el penúltimo segmento génico V; en una realización, la secuencia está en una posición detrás del segmento génico V final y el primer segmento génico D.

En una realización, los ratones macho comprenden un homólogo u ortólogo de ADAM6 o fragmento funcional de los mismos que está localizado en una posición en un locus de inmunoglobulina endógeno que es igual o sustancialmente igual que en un ratón macho de tipo silvestre. En una realización específica, el locus endógeno es incapaz de codificar la región variable de cadena pesada de un anticuerpo, en donde la región variable comprende o procede de un segmento génico de ratón endógeno. En una realización específica, el locus endógeno está situado en una localización en el genoma del ratón macho que lo hace incapaz de codificar la región variable de cadena pesada de un anticuerpo. Los ratones macho comprenden una secuencia de ADAM6 localizada en el mismo cromosoma que segmentos génicos de inmunoglobulina humana y la secuencia de ADAM6 codifica una proteína ADAM6 funcional.

También se desvela un ratón macho que comprende un gen de ADAM6 endógeno no funcional, o una supresión de un gen de ADAM6 endógeno, en su línea germinal; en donde las células espermáticas del ratón son capaces de atravesar un oviducto de un ratón hembra y fertilizar un óvulo.

También se desvela un ratón macho que comprende un gen de ADAM6 endógeno funcional y una modificación para un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno. La modificación puede realizarse cadena abajo, o 3', del gen de ADAM6 endógeno. La modificación puede ser un reemplazo de uno o más segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos con uno o más segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina humana. La modificación puede ser una inserción de uno o más segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina humana cadena arriba de un gen de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno.

También se desvelan ratones que comprenden una modificación genética que reduce la función de ADAM6 de ratón endógena, en donde el ratón comprende al menos algo de funcionalidad de ADAM6 proporcionada por un alelo sin modificar endógeno que es funcional completamente o en parte (por ejemplo, un heterocigoto), o mediante expresión de una secuencia ectópica que codifica un ADAM6 o un ortólogo u homólogo o fragmento funcional del mismo que es funcional en un ratón macho.

En una realización, los ratones comprenden suficiente función de ADAM6 para conferir a ratones macho la capacidad de generar descendencia por apareamiento, en comparación con ratones macho que carecen de un ADAM6 funcional. Los homólogos u ortólogos de ADAM6 o fragmentos de los mismos que son funcionales en un ratón macho incluyen los que restauran, completamente o en parte, la pérdida de capacidad para generar descendencia observada en un ratón macho que carece de suficiente actividad de ADAM6 de ratón endógena, por ejemplo, la pérdida de la capacidad observada en un ratón con desactivación de ADAM6. En este sentido los ratones con desactivación de ADAM6 incluyen ratones que comprenden un locus endógeno o fragmento del mismo, pero que no es funcional, es decir, que no expresa ADAM6 (ADAM6a y/o ADAM6b) en absoluto, o que expresa ADAM6 (ADAM6a y/o ADAM6b) a un nivel

- que es insuficiente para mantener una capacidad esencialmente normal para generar descendencia de un ratón macho de tipo silvestre. La pérdida de función puede deberse, por ejemplo, a una modificación en un gen estructural del locus (es decir, en una región codificante de ADAM6a o ADAM6b) o en una región reguladora del locus (por ejemplo, en una secuencia 5' del gen de ADAM6a, o 3' de la región codificante de ADAM6a o ADAM6b, en donde la secuencia controla, totalmente o en parte, la transcripción de un gen de ADAM6, la expresión de un ARN de ADAM6 o la expresión de una proteína ADAM6). En diversas realizaciones, son ortólogos u homólogos o fragmentos de los mismos que son funcionales en un ratón macho los que permiten que un espermatozoide de un ratón macho (o la mayoría de células espermáticas en el semen de un ratón macho) atraviesen un oviducto de ratón y fertilicen un óvulo de ratón.
- En una realización, los ratones macho que expresan la región variable de inmunoglobulina humana o fragmento funcional de la misma comprenden suficiente actividad de ADAM6 para conferir a los ratones macho la capacidad de generar descendencia por apareamiento con ratones hembra y, en una realización, los ratones macho muestran la capacidad de generar descendencia cuando se aparean con ratones hembra que es en una realización al menos 25 %, en una realización al menos 30 %, en una realización al menos 40 %, en una realización al menos 50 %, en una realización al menos 60 %, en una realización al menos 70 %, en una realización al menos 80 %, en una realización al menos 90 % y en una realización aproximadamente igual que la de ratones con uno o más alelos de ADAM6 sin modificar endógenos.
- En una realización los ratones macho expresan suficiente ADAM6 (o un ortólogo u homólogo o fragmento funcional del mismo) para permitir que una célula espermática de los ratones macho atraviese un oviducto de ratón hembra y fertilice un óvulo de ratón.
- [Eliminado]
- Se desvelan ratones modificados genéticamente y células que comprenden una modificación de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno, en donde los ratones expresan al menos una parte de una secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina, por ejemplo, al menos una parte de una secuencia humana, en donde los ratones comprenden una actividad de ADAM6 que es funcional en un ratón macho. La modificación puede reducir o erradicar una actividad de ADAM6 del ratón. El ratón puede modificarse de modo que ambos alelos que codifican la actividad de ADAM6 estén ausentes o expresen un ADAM6 que no actúa sustancialmente para mantener el apareamiento normal en un ratón macho. El ratón puede comprender además una secuencia de ácido nucleico ectópica que codifica un ADAM6 de ratón u ortólogo u homólogo o fragmento funcional del mismo. La modificación puede mantener la actividad de ADAM6 del ratón y produce un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno incapaz de codificar una región variable de cadena pesada de un anticuerpo. La modificación puede incluir inversiones y/o translocaciones cromosómicas que hacen a los segmentos génicos variables de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos incapaces de reordenarse para codificar una región variable de cadena pesada de anticuerpo que está unida operativamente con una región constante de cadena pesada.
- Se desvelan ratones modificados y células que comprenden una modificación de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno, en donde la modificación reduce o elimina la actividad de ADAM6 expresada a partir de una secuencia de ADAM6 del locus, y en donde los ratones comprenden una proteína ADAM6 u ortólogo u homólogo o fragmento funcional de la misma. La proteína ADAM6 o fragmento de la misma puede estar codificada por una secuencia de ADAM6 ectópica. La proteína ADAM6 o fragmento de la misma puede estar expresada a partir de un alelo de ADAM6 endógeno. El ratón puede comprender un primer alelo de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una primera modificación que reduce o elimina la expresión de un ADAM6 funcional del primer alelo de cadena pesada de inmunoglobulina, y el ratón puede comprender un segundo alelo de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una segunda modificación que no reduce sustancialmente o no elimina la expresión de un ADAM6 funcional del segundo alelo de cadena pesada de inmunoglobulina.
- La modificación puede ser la inserción de uno o más segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina humana cadena arriba, o 5', de un gen de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno. La modificación puede mantener el gen de ADAM6 endógeno localizado en el locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno.
- La segunda modificación puede localizarse 3' (con respecto a la direccionalidad transcripcional del segmento génico V de ratón) de un segmento génico V de ratón final y localizarse 5' (con respecto a la direccionalidad transcripcional de la secuencia constante) de un gen constante de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón (o quimérico humano/de ratón) o fragmento del mismo (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un ser humano y/o ratón: C_H1 y/o bisagra y/o C_H2 y/o C_H3).
- La modificación puede ser en un primer alelo de cadena pesada de inmunoglobulina en un primer locus que codifica un primer alelo de ADAM6 y la función de ADAM6 resulta de la expresión de un ADAM6 endógeno en un segundo alelo de cadena pesada de inmunoglobulina en un segundo locus que codifica un ADAM6 funcional, en donde el segundo alelo de cadena pesada de inmunoglobulina comprende al menos una modificación de un segmento génico V, D y/o J. La al menos una modificación del segmento génico V, D y/o J puede ser una supresión, un reemplazo con un segmento génico V, D y/o J humano, un reemplazo con un segmento génico V, D y/o J de camélido, un reemplazo

con un segmento génico V, D y/o J humanizado o camelizado, un reemplazo de una secuencia de cadena pesada con una secuencia de cadena ligera, y una combinación de los mismos. La al menos una modificación puede ser la supresión de uno o más segmentos génicos de V, D y/o J de cadena pesada y un reemplazo con uno o más segmentos génicos V y/o J de cadena ligera (por ejemplo, un segmento génico V y/o J de cadena ligera humano) en el locus de

[Eliminado]

[Eliminado]

En una realización, la modificación está en un primer alelo de cadena pesada de inmunoglobulina en un primer locus y un segundo alelo de cadena pesada de inmunoglobulina en un segundo locus, y la función de ADAM6 resulta de la expresión de una secuencia de ADAM6 ectópica en el primer alelo de cadena pesada de inmunoglobulina. En una realización, la modificación está en un primer alelo de cadena pesada de inmunoglobulina en un primer locus y un segundo alelo de cadena pesada de inmunoglobulina en un segundo locus, y la función o actividad de ADAM6 resulta de la expresión de un ADAM6 ectópico en el segundo alelo de cadena pesada de inmunoglobulina.

Se desvela un ratón que comprende una desactivación heterocigota u homocigota de ADAM6. El ratón puede comprender además una secuencia de inmunoglobulina modificada que es una secuencia de inmunoglobulina humana o humanizada, o una secuencia de inmunoglobulina de camélido o camelizada, humana o de ratón. La secuencia de inmunoglobulina modificada puede estar presente en el locus de inmunoglobulina de cadena pesada endógeno. La secuencia de inmunoglobulina modificada puede comprender una secuencia de gen variable de cadena pesada humana en un locus de inmunoglobulina de cadena pesada endógeno. La secuencia de gen variable de cadena pesada humana puede reemplazar una secuencia variable de cadena pesada endógena en el locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno.

También se desvela un ratón incapaz de expresar un ADAM6 de ratón endógeno funcional a partir de un locus de ADAM6 de ratón endógeno. El ratón puede comprender una secuencia de ácido nucleico ectópica que codifica un ADAM6, o fragmento funcional del mismo, que es funcional en el ratón. La secuencia de ácido nucleico ectópica puede codificar una proteína que rescata una pérdida de la capacidad para generar descendencia mostrada por un ratón macho que es homocigoto para una desactivación de ADAM6. La secuencia de ácido nucleico ectópica puede codificar una proteína ADAM6 de ratón.

Se describe un ratón que carece de un locus de ADAM6 endógeno funcional, y que comprende una secuencia de ácido nucleico ectópica que confiere al ratón función de ADAM6. La secuencia de ácido nucleico puede comprender una secuencia de ADAM6 de ratón endógena o fragmento funcional de la misma. La secuencia de ADAM6 de ratón endógena comprende secuencia codificante de ADAM6a y ADAM6b localizada en un ratón de tipo silvestre entre el segmento génico V de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón más 3' (V_H) y el segmento génico D de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón más 5' (D_H).

Se describe una secuencia de ácido nucleico que codifica ADAM6a de ratón o fragmento funcional del mismo y/o una secuencia que codifica ADAM6b de ratón o fragmento funcional del mismo, en donde el ADAM6a y/o ADAM6b o fragmento o fragmentos funcionales de los mismos está unido operativamente con un promotor. El promotor puede ser un promotor humano. El promotor puede ser el promotor de ADAM6 de ratón. La secuencia que comprende el promotor de ADAM6 puede localizarse entre el primer codón del primer gen de ADAM6 más cerca del segmento génico D_H más 5' de ratón y la secuencia señal de recombinación del segmento génico D_H más 5', en donde 5' está indicado con respecto a la dirección de la transcripción de los genes de inmunoglobulina de ratón. El promotor puede ser un promotor vírico. El promotor vírico puede ser un promotor de citomegalovirus (CMV). El promotor puede ser un promotor de ubiquitina.

El promotor puede ser un promotor inducible. El promotor inducible puede regular la expresión en tejidos no reproductivos. El promotor inducible puede regular la expresión en tejidos reproductivos. La expresión de las secuencias de ADAM6a y/o ADAM6b de ratón o fragmento o fragmentos funcionales de las mismas puede regularse según el desarrollo por el promotor inducible en tejidos reproductivos.

En una realización, el ADAM6a y/o ADAM6b de ratón se seleccionan del ADAM6a de la SEQ ID NO: 1 y/o ADAM6b de la secuencia SEQ ID NO: 2. En una realización, el promotor de ADAM6 de ratón es un promotor de la SEQ ID NO: 3. En una realización específica, el promotor de ADAM6 de ratón comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 3 directamente cadena arriba (con respecto a la dirección de la transcripción de ADAM6a) del primer codón de ADAM6a y que se extiende hasta el final de la SEQ ID NO: 3 cadena arriba de la región codificante de ADAM6. En otra realización específica, el promotor de ADAM6 es un fragmento que se extiende desde aproximadamente 5 a aproximadamente 20 nucleótidos cadena arriba del codón de inicio de ADAM6a hasta aproximadamente 0,5 kb, 1 kb, 2 kb o 3 kb o más cadena arriba del codón de inicio de ADAM6a.

En una realización, la secuencia de ácido nucleico comprende la SEQ ID NO: 3 o un fragmento de la misma que cuando se sitúa en un ratón que es infértil o que tiene baja fertilidad debido a una carencia de ADAM6, mejora la

fertilidad o restaura la fertilidad hasta aproximadamente una fertilidad de tipo silvestre. En una realización, la SEQ ID NO: 3 o un fragmento de la misma confiere a un ratón macho la capacidad de producir una célula espermática que es capaz de atravesar un oviducto de ratón hembra para fertilizar un óvulo de ratón.

En una realización, la secuencia de ácido nucleico es cualquier secuencia que codifique un gen de ADAM6 u homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo que cuando se sitúa en o se mantiene en un ratón produce un nivel de fertilidad que es igual o comparable a un ratón de tipo silvestre. Puede demostrarse un nivel ejemplar de fertilidad por la capacidad de un ratón macho para producir una célula espermática que es capaz de atravesar un oviducto de ratón hembra para fertilizar un óvulo de ratón.

También se desvela un ratón que comprende una supresión de una secuencia de nucleótidos endógena que codifica una proteína ADAM6, un reemplazo de un segmento génico V_H de ratón endógeno con un segmento génico V_H humano, y una secuencia de nucleótidos ectópica que codifica una proteína ADAM6 de ratón u ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho.

En un caso, el ratón comprende un locus de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una supresión de una secuencia de nucleótidos de locus de inmunoglobulina endógeno que comprende un gen de ADAM6 endógeno, comprende una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más segmentos génicos de inmunoglobulina humana, y en donde la secuencia de nucleótidos ectópica que codifica la proteína ADAM6 de ratón está dentro de o directamente adyacente a la secuencia de nucleótidos que codifica el o los segmentos génicos de inmunoglobulina humana.

En una realización, el ratón comprende un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H endógenos con una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más segmentos génicos V_H humanos, y la secuencia de nucleótidos ectópica que codifica la proteína ADAM6 de ratón está dentro de la secuencia de nucleótidos que codifica el o los segmentos génicos V_H humanos. En una realización, el ratón comprende además un reemplazo de uno o más segmentos génicos D_H endógenos con uno o más segmentos génicos D_H humanos en el locus de gen de D_H endógeno. En una realización, el ratón comprende además un reemplazo de uno o más segmentos génicos J_H endógenos con uno o más segmentos génicos J_H humanos en el locus del gen de J_H endógeno. En una realización, el ratón comprende un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H , D_H y J_H endógenos y un reemplazo en los loci de los genes de V_H , D_H y J_H endógenos con segmentos génicos V_H , D_H y J_H humanos, en donde el ratón comprende una secuencia ectópica que codifica una proteína ADAM6 de ratón. En una realización, el ratón comprende una inserción de segmentos génicos V_H , D_H y J_H humanos en un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno, en donde el ratón comprende un gen de ADAM6 que es funcional en el ratón. En una realización específica, la secuencia ectópica que codifica la proteína ADAM6 de ratón se sitúa entre el penúltimo segmento génico V_H más 3' de los segmentos génicos V_H humanos presentes, y el último segmento génico V_H 3' de los segmentos génicos V_H humanos presentes. En una realización específica, el ratón comprende una supresión de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón, y un reemplazo con todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H humanos, y la secuencia de nucleótidos ectópica que codifica la proteína ADAM6 de ratón se sitúa cadena abajo del segmento génico humano V_H1-2 y cadena arriba del segmento génico humano V_H6-1 .

En una realización específica, el ratón comprende un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H endógenos con una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más segmentos génicos V_H humanos, y la secuencia de nucleótidos ectópica que codifica la proteína ADAM6 de ratón está dentro de la secuencia de nucleótidos que codifica el o los segmentos génicos V_H humanos.

[Eliminado]

Se describe un ratón que comprende una modificación de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno, en donde el ratón expresa un linfocito B que comprende una secuencia de inmunoglobulina reordenada unida operativamente con una secuencia génica de región constante de cadena pesada, y el linfocito B comprende en su genoma (por ejemplo, en un cromosoma de linfocito B) un gen que codifica un ADAM6 u ortólogo u homólogo o fragmento del mismo que es funcional en un ratón macho. La secuencia de inmunoglobulina reordenada puede unirse operativamente con la secuencia génica de región constante de cadena pesada que comprende una secuencia V, D y/o J de cadena pesada humana; una secuencia V, D y/o J de cadena pesada humana; una secuencia V y/o J de cadena ligera humana. En una realización, la secuencia génica de región constante de cadena pesada comprende una secuencia de cadena pesada humana o de ratón seleccionada del grupo que consiste en una C_H1 , una bisagra, una C_H2 , una C_H3 y una combinación de las mismas.

En un aspecto, el ratón proporcionado comprende un locus de gen variable de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno funcionalmente silenciado, en donde la función de ADAM6 se mantiene en el ratón, y comprende además una inserción de uno o más segmentos génicos de inmunoglobulina humana cadena arriba o 5' de una o más regiones constantes de cadena pesada de ratón. El o los segmentos génicos de inmunoglobulina humana incluyen uno o más segmentos génicos V_H humanos, uno o más segmentos génicos D_H humanos y uno o más segmentos génicos J_H humanos. En una realización específica, el ratón comprende además un locus de cadena ligera endógeno funcionalmente silenciado, en donde el ratón comprende una actividad ADAM6 que es igual o comparable a un ratón de tipo silvestre, y comprende además una inserción de uno o más segmentos génicos de cadena ligera λ humanos

cadena arriba o 5' de una región constante de cadena ligera de ratón. En una realización, los segmentos génicos de cadena ligera λ humanos comprenden 12 segmentos génicos V λ humanos y uno o más segmentos génicos J λ humanos. En una realización, los segmentos génicos de cadena ligera λ humanos comprenden 12 segmentos génicos V λ humanos y cuatro segmentos génicos J λ humanos. En una realización, los segmentos génicos de cadena ligera λ humanos comprenden 28 segmentos génicos V λ humanos y uno o más segmentos génicos J λ humanos. En una realización, los segmentos génicos de cadena ligera λ humanos comprenden 28 segmentos génicos V λ humanos y cuatro segmentos génicos J λ humanos. En una realización, los segmentos génicos de cadena ligera λ humanos comprenden 40 segmentos génicos V λ humanos y uno o más segmentos génicos J λ humanos. En una realización, los segmentos génicos de cadena ligera λ humanos comprenden 40 segmentos génicos V λ humanos y cuatro segmentos génicos J λ humanos. En diversas realizaciones, los cuatro segmentos génicos J λ humanos incluyen J λ 1, J λ 2, J λ 3 y J λ 7. La región constante de cadena ligera de ratón es una CK de ratón.

En un aspecto, en el ratón modificado genéticamente proporcionado, el ratón comprende un gen de cadena ligera de inmunoglobulina silenciado funcionalmente, y comprende además un reemplazo de uno o más segmentos génicos de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos con uno o más segmentos génicos de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana, en donde el ratón carece de un locus ADAM6 endógeno funcional, y en donde el ratón comprende una secuencia de nucleótidos ectópica que expresa una proteína ADAM6 de ratón o un ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho.

En un aspecto, el ratón proporcionado carece de un locus ADAM6 de ratón endógeno funcional o secuencia y comprende una secuencia de nucleótidos ectópica que codifica un locus de ADAM6 de ratón o fragmento funcional de un locus o secuencia de ADAM6 de ratón, en donde el ratón es capaz de aparearse con un ratón del sexo opuesto para producir una descendencia que comprende el locus o secuencia de ADAM6 ectópico. En una realización, el ratón es macho. En una realización, el ratón es hembra.

En un aspecto, el ratón modificado genéticamente proporcionado comprende un segmento génico de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humano en un locus de gen de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón endógeno, el ratón carece de una secuencia de ADAM6 funcional endógena en el locus de gen de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón endógeno y en donde el ratón comprende una secuencia de nucleótidos ectópica que expresa una proteína ADAM6 de ratón o un ortólogo u homólogo o fragmento del mismo que es funcional en un ratón macho.

[Eliminado] En una realización, la secuencia de nucleótidos ectópica que expresa la proteína ADAM6 de ratón se integra en uno o más loci en un genoma del ratón que es un locus de inmunoglobulina de cadena pesada.

Se describe un ratón que expresa una secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón endógeno modificado, en donde la cadena pesada procede de un segmento génico V humano, un segmento génico D y un segmento génico J, en donde el ratón comprende una actividad de ADAM6 que es funcional en el ratón.

En una realización, el ratón comprende una pluralidad de segmentos génicos V humanos, una pluralidad de segmentos génicos D humanos y una pluralidad de segmentos génicos J humanos. En una realización, el ratón comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada humanizada, en donde la humanización comprende el reemplazo de una secuencia seleccionada de una C_H1, bisagra, C_H2, C_H3 y una combinación de las mismas. En una realización específica, la cadena pesada procede de un segmento génico V humano, un segmento génico D humano, un segmento génico J humano, una secuencia de C_H1 humana, una secuencia bisagra humana o de ratón, una secuencia C_H2 de ratón y una secuencia C_H3 de ratón. En otra realización específica, el ratón comprende además una secuencia constante de cadena ligera humana.

En una realización, el ratón comprende un gen de ADAM6 que está flanqueado en 5' y 3' por segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos. En una realización específica, los segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos son incapaces de codificar una cadena pesada de un anticuerpo.

En una realización, el segmento génico V está flanqueado en 5' (con respecto a la dirección transcripcional del segmento génico V) por una secuencia que codifica una actividad de ADAM6 que es funcional en el ratón.

En una realización, el segmento génico V está flanqueado en 3' (con respecto a la dirección transcripcional del segmento génico V) por una secuencia que codifica una actividad de ADAM6 que es funcional en el ratón.

En una realización, el segmento génico D está flanqueado en 5' (con respecto a la dirección transcripcional del segmento génico D) por una secuencia que codifica una actividad de ADAM6 que es funcional en el ratón.

En una realización, la actividad de ADAM6 que es funcional en el ratón resulta de la expresión de una secuencia de nucleótidos localizada en dirección 5' del segmento génico D más 5' y 3' del segmento génico V más 3' (con respecto a la dirección de la transcripción del segmento génico V) del locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón endógeno modificado.

- En una realización, la actividad de ADAM6 que es funcional en el ratón resulta de la expresión de una secuencia de nucleótidos localizada entre dos segmentos génicos V humanos en el locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón endógeno modificado. En una realización, los dos segmentos génicos V humanos son un segmento génico V_H1-2 humano y un segmento génico V_H6-1.
- La secuencia de nucleótidos comprende una secuencia seleccionada de una secuencia de ADAM6b de ratón o fragmento funcional de la misma y una secuencia de ADAM6a de ratón o fragmento funcional de la misma.
- En una realización, la secuencia de nucleótidos entre los dos segmentos génicos V humanos se sitúa en orientación de transcripción inversa con respecto a los segmentos génicos V humanos. En una realización específica, la secuencia de nucleótidos codifica, de 5' a 3' con respecto a la dirección de la transcripción de genes de ADAM6, y secuencia de ADAM6a seguida por una secuencia de ADAM6b.
- En una realización, el ratón comprende un reemplazo de una secuencia pseudogénica de ADAM6 humana entre los segmentos génicos V humanos V_H1-2 y V_H6-1 con una secuencia de ADAM6 de ratón o un fragmento funcional de la misma.
- En una realización, la secuencia que codifica la actividad de ADAM6 que es funcional en el ratón es una secuencia de ADAM6 de ratón o fragmento funcional de la misma.
- Se desvela un ratón que comprende un segmento génico DFL16.1 de ratón endógeno (por ejemplo, en un ratón heterocigoto para el locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón endógeno modificado) o un segmento génico D_H1-1 humano. El segmento génico D de la cadena pesada de inmunoglobulina expresada por el ratón puede proceder de un segmento génico DFL16.1 de ratón endógeno o un segmento génico D_H1-1 humano.
- Se describe un ratón que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un ADAM6 de ratón (u homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo) en una célula portadora de ADN de linaje de linfocitos B no reordenado, pero no comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica el ADAM6 de ratón (u homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo) en un linfocito B que comprende loci de inmunoglobulina reordenados, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica el ADAM6 de ratón (u homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo) aparece en el genoma en una posición que es diferente de una posición en la que un gen de ADAM6 de ratón aparece en un ratón de tipo silvestre. La secuencia de ácido nucleico que codifica el ADAM6 de ratón (u homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo) puede estar presente en todas o sustancialmente todas las células portadoras de ADN que no son de linaje de linfocitos B reordenado; la secuencia de ácido nucleico puede estar presente en células de línea germinal del ratón, pero no en un cromosoma de un linfocito B reordenado.
- Se describe un ratón que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un ADAM6 de ratón (u homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo) en todas o sustancialmente todas las células portadoras de ADN, incluyendo linfocitos B que comprenden loci de inmunoglobulina reordenados, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica el ADAM6 de ratón (u homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo) aparece en el genoma en una posición que es diferente de una posición en la que un gen de ADAM6 de ratón aparece en un ratón de tipo silvestre. La secuencia de ácido nucleico que codifica el ADAM6 de ratón (u homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo) puede estar en un ácido nucleico que es contiguo con el locus de inmunoglobulina reordenado. El ácido nucleico que puede ser contiguo con el locus de inmunoglobulina reordenado es un cromosoma. El cromosoma puede ser un cromosoma que se halla en un ratón de tipo silvestre y el cromosoma comprende una modificación de un locus de inmunoglobulina de ratón.

- Se describe un ratón modificado genéticamente, en donde el ratón comprende un linfocito B que comprende en su genoma una secuencia de ADAM6 u ortólogo u homólogo de la misma. La secuencia de ADAM6 u ortólogo u homólogo de la misma puede estar en un locus de cadena pesada de inmunoglobulina. La secuencia de ADAM6 u ortólogo u homólogo de la misma puede estar en un locus que no es un locus de inmunoglobulina. La secuencia de ADAM6 puede estar en un transgén conducido por un promotor heterólogo. El promotor heterólogo puede ser un promotor distinto de inmunoglobulina. Se describe un linfocito B que expresa una proteína ADAM6 u ortólogo u homólogo de la misma.
- 90 % o más de los linfocitos B del ratón pueden comprender un gen que codifica una proteína ADAM6 o un ortólogo de la misma o un homólogo de la misma o un fragmento de la misma que es funcional en el ratón. El ratón puede ser un ratón macho.
- Se describe un genoma de linfocitos B que comprende un primer alelo y un segundo alelo que comprende la secuencia de ADAM6 u ortólogo u homólogo de la misma. El genoma de linfocitos B puede comprender un primer alelo pero no un segundo alelo que comprende la secuencia de ADAM6 u ortólogo u homólogo de la misma.
- Se describe un ratón que comprende una modificación en uno o más alelos de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos, en donde la modificación mantiene uno o más alelos de ADAM6 endógenos y el ratón comprende además una inserción de uno o más segmentos génicos V λ humanos y uno o más segmentos génicos J λ humanos cadena arriba de una región constante de cadena ligera de ratón. La región constante de cadena ligera de ratón es una C κ de ratón.
- La modificación puede hacer al ratón incapaz de expresar una cadena pesada funcional que comprende segmentos génicos de cadena pesada endógenos reordenados a partir de al menos un alelo de cadena pesada y mantiene un alelo de ADAM6 endógeno localizado en el al menos un alelo de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno.
- Los ratones pueden ser incapaces de expresar una cadena pesada funcional que comprende segmentos génicos de cadena pesada endógenos reordenados de al menos uno de los alelos de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos, y los ratones expresan una proteína ADAM6 a partir de un alelo de ADAM6 endógeno. Los ratones pueden ser incapaces de expresar una cadena pesada funcional que comprende segmentos génicos de cadena pesada endógenos reordenados a partir de dos alelos de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos, y los ratones pueden expresar una proteína ADAM6 de uno o más alelos de ADAM6 endógenos.
- Los ratones pueden ser incapaces de expresar una cadena pesada funcional de cada alelo de cadena pesada endógeno, y los ratones comprenden un alelo de ADAM6 funcional localizado a una distancia de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 o 120 o más Mpb cadena arriba (con respecto a la dirección de transcripción del locus de cadena pesada de ratón) de una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón. El alelo de ADAM6 funcional está en el locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno (por ejemplo, en una región V-D intergénica, entre dos segmentos génicos V, entre un segmento génico V y uno D, entre un segmento génico D y uno J, etc.). En una realización específica, el alelo de ADAM6 funcional está localizado a una distancia de 90 a 100 kb de secuencia intergénica entre el segmento génico V de ratón final y el primer segmento génico D de ratón.
- Se describe un ratón que comprende una modificación en uno o más alelos de ADAM6 endógenos.
- La modificación puede hacer al ratón incapaz de expresar una proteína ADAM6 funcional de al menos uno de los uno o más alelos de ADAM6 endógenos. El ratón puede ser incapaz de expresar una proteína ADAM6 funcional de cada uno de los alelos de ADAM6 endógenos.
- Los ratones pueden ser incapaces de expresar una proteína ADAM6 funcional de cada alelo de ADAM6 endógeno, y los ratones comprenden una secuencia de ADAM6 ectópica.
- Los ratones pueden ser incapaces de expresar una proteína ADAM6 funcional de cada alelo de ADAM6 endógeno, y los ratones comprenden una secuencia de ADAM6 ectópica localizada a una distancia de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 o 120 o más kb cadena arriba (con respecto a la dirección de transcripción del locus de cadena pesada de ratón) de una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón. La secuencia de ADAM6 ectópica puede estar en el locus de cadena pesada endógeno (por ejemplo, en una región V-D intergénica, entre dos segmentos génicos V, entre un segmento génico V y uno D, entre un segmento génico D y uno J, etc.). La secuencia de ADAM6 ectópica puede localizarse a una distancia de 90 a 100 kb de secuencia intergénica entre el segmento génico V de ratón final y el primer segmento génico D de ratón. La secuencia V-D intergénica de 90 a 100 kb endógena puede retirarse, y la secuencia de ADAM6 ectópica se sitúa entre el segmento génico V final y el primer segmento génico D.
- Se describe un ratón macho infértil, en donde el ratón comprende una supresión de dos o más alelos de ADAM6 endógenos. También se describe un ratón hembra que es un portador de un rasgo de infertilidad masculina, en donde el ratón hembra comprende en su línea germinal un alelo de ADAM6 no funcional o una desactivación de un alelo de

ADAM6 endógeno.

- Se describe un ratón que comprende un segmento génico V, D y/o J de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que es incapaz de reordenarse para codificar una cadena pesada de un anticuerpo, en donde la mayoría de los linfocitos B del ratón comprenden un gen de ADAM6 funcional. La mayoría de los linfocitos B del ratón pueden comprender además uno o más segmentos génicos V λ humanos y uno o más segmentos génicos J λ humanos cadena arriba de una región constante de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón. La región constante de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón es una CK de ratón.
- En una realización, el ratón comprende segmentos génicos V, D y J de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos intactos que son incapaces de reordenarse para codificar una cadena pesada funcional de un anticuerpo. En una realización, el ratón comprende al menos uno y hasta 89 segmentos génicos V, al menos uno y hasta 13 segmentos génicos D, al menos uno y hasta cuatro segmentos génicos J, y una combinación de los mismos; en donde los al menos uno y hasta 89 segmentos génicos V, al menos uno y hasta 13 segmentos génicos D, al menos uno y hasta cuatro segmentos génicos J son incapaces de reordenarse para codificar una región variable de cadena pesada de un anticuerpo. En una realización específica, el ratón comprende un gen de ADAM6 funcional localizado en los segmentos génicos V, D y J de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos intactos. En una realización, el ratón comprende un locus de cadena pesada endógeno que incluye un locus de ADAM6 endógeno, en donde el locus de cadena pesada endógeno comprende 89 segmentos génicos V, 13 segmentos génicos D y cuatro segmentos génicos J, en donde los segmentos génicos de cadena pesada endógenos son incapaces de reordenarse para codificar una región variable de cadena pesada de un anticuerpo y el locus de ADAM6 codifica una proteína ADAM6 que es funcional en el ratón.
- Se describe un ratón que carece de un segmento génico V, D y J de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno, en donde una mayoría de los linfocitos B del ratón comprenden una secuencia de ADAM6 u ortólogo u homólogo de la misma. La mayoría de los linfocitos B del ratón pueden expresar una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio variable lambda humano y una región constante de cadena ligera de inmunoglobulina endógena.
- En una realización, el ratón carece de segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos seleccionados de dos o más segmentos génicos V, dos o más segmentos génicos D, dos o más segmentos génicos J y una combinación de los mismos. En una realización, el ratón carece de segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina seleccionados desde al menos uno y hasta 89 segmentos génicos V, al menos uno y hasta 13 segmentos génicos D, al menos uno y hasta cuatro segmentos génicos J, y una combinación de los mismos. En una realización, el ratón carece de un fragmento de ADN genómico del cromosoma 12 que comprende aproximadamente tres megabases del locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno. En una realización específica, el ratón carece de todos los segmentos génicos V, D y J de cadena pesada endógenos funcionales. En una realización específica, el ratón carece de 89 segmentos génicos V_H, 13 segmentos génicos D_H y cuatro segmentos génicos J_H.
- Se describe un ratón en donde el ratón tiene un genoma en la línea germinal que comprende una modificación de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina, en donde la modificación del locus de cadena pesada de inmunoglobulina comprende el reemplazo de una o más secuencias de región variable de inmunoglobulina de ratón con una o más secuencias de región variable de inmunoglobulina humanas, y en donde el ratón comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6 de ratón. Las secuencias D_H y J_H y al menos 3, al menos 10, al menos 20, al menos 40, al menos 60 o al menos 80 secuencias V_H del locus de cadena pesada de inmunoglobulina pueden reemplazarse por secuencias de región variable de inmunoglobulina humanas. Las secuencias D_H, J_H y todas las V_H del locus de cadena pesada de inmunoglobulina pueden reemplazarse por secuencias de región variable de inmunoglobulina humana. Las secuencias de región variable de inmunoglobulina humana pueden no estar reordenadas. Las secuencias de región variable de inmunoglobulina humana pueden comprender regiones D_H y J_H no reordenadas completas, y al menos 3, al menos 10, al menos 20, al menos 40, al menos 60 o al menos 80 secuencias V_H no reordenadas que son humanas. En una realización preferida adicional, las secuencias de región variable de inmunoglobulina distinta de ratón comprenden la región variable humana completa, incluyendo todas las regiones V_H, D_H y J_H.
- Se describe un ratón que expresa un anticuerpo que comprende al menos un polipéptido de inmunoglobulina de dominio variable humano/dominio constante no humano, en donde el ratón expresa una proteína ADAM6 de ratón u ortólogo u homólogo de la misma de un locus distinto de un locus de inmunoglobulina.
- La proteína ADAM6 u ortólogo u homólogo de la misma puede expresarse en un linfocito B del ratón, en donde el linfocito B comprende una secuencia de inmunoglobulina reordenada que comprende una secuencia variable humana y una secuencia constante no humana.
- En una realización, la secuencia constante no humana es una secuencia de roedor. En una realización, el roedor se selecciona de un ratón, una rata y un hámster.
- Se describe un método para preparar un ratón macho infértil, que comprende hacer a un alelo de ADAM6 endógeno

de una célula ES donante no funcional (o desactivar dicho alelo), introducir la célula ES donante en un embrión hospedador, gestar el embrión hospedador en una madre sustituta y permitir que la madre sustituta dé a luz a la descendencia procedente completamente o en parte de la célula ES donante. El método puede comprender además criar descendencia para obtener un ratón macho infértil.

Se describe un método para preparar un ratón con una modificación genética de interés, en donde el ratón es infértil, comprendiendo el método las etapas de (a) realizar una modificación genética de interés en un genoma; (b) modificar el genoma para desactivar un alelo de ADAM6 endógeno o hacer a un alelo de ADAM6 endógeno no funcional; y (c) emplear el genoma para preparar un ratón. El genoma puede ser de una célula ES o usarse en un experimento de transferencia nuclear.

Se describe un ratón preparado usando un vector de dirección, construcción de nucleótidos o célula como se describe en el presente documento.

Se describe una descendencia de un apareamiento de un ratón como se describe en el presente documento con un segundo ratón que es un ratón de tipo silvestre o modificado genéticamente.

Se describe un método para mantener una cepa de ratón, en donde la cepa de ratón comprende un reemplazo de una secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón con una o más secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina heterólogas que son secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina humana.

En una realización, la cepa de ratón comprende una supresión de uno o más segmentos génicos V_H , D_H y/o J_H de ratón. El ratón comprende además uno o más segmentos génicos V_H humanos, uno o más segmentos génicos D_H humanos y/o uno o más segmentos génicos J_H humanos. En una realización, el ratón comprende al menos 3, al menos 10, al menos 20, al menos 40, al menos 60 o al menos 80 segmentos V_H humanos, al menos 27 segmentos génicos D_H humanos y al menos seis segmentos génicos J_H . En una realización específica, el ratón comprende al menos 3, al menos 10, al menos 20, al menos 40, al menos 60 o al menos 80 segmentos V_H humanos, los al menos 27 segmentos génicos D_H humanos y los al menos seis segmentos génicos J_H están unidos operativamente con un gen de región constante. En una realización, el gen de región constante es un gen de región constante del ratón. En una realización, el gen de región constante comprende una secuencia de gen de región constante de ratón seleccionada de una C_H1 , una bisagra, una C_H2 , una C_H3 y/o una C_H4 o una combinación de las mismas.

Se describe un método que comprende generar un ratón macho heterocigoto para el reemplazo de la secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón y criar el ratón macho heterocigoto con un ratón hembra de tipo silvestre o un ratón hembra que es homocigoto o heterocigoto para la secuencia de cadena pesada humana. El método puede comprender mantener la cepa criando repetidas veces machos heterocigotos con hembras que son de tipo silvestre u homocigotas o heterocigotas para la secuencia de cadena pesada humana.

El método puede comprender obtener células de ratones macho o hembra homocigotos o heterocigotos para la secuencia de cadena pesada humana y emplear esas células como células donantes o núcleos de las mismas como núcleos donantes, y usar las células o núcleos para preparar animales modificados genéticamente usando células hospedadoras y/o gestar las células y/o los núcleos en madres sustitutas.

[Eliminado]

En una realización, el ratón comprende además un reemplazo de secuencias variables de cadena ligera λ y/o κ en un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno con secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina heterólogas. Las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina heterólogas son secuencias variables de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana y también pueden incluir secuencias variables de cadena ligera κ .

[Eliminado]

Se describe una construcción de ácido nucleico, que comprende una rama de homología cadena arriba y una rama de homología cadena abajo, en donde la rama de homología cadena arriba comprende una secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana, comprendiendo la rama de homología cadena abajo una secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia de región variable de inmunoglobulina humana y de ratón y dispuesta entre las ramas de homología cadena arriba y cadena abajo hay una secuencia que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAM6 de ratón. La secuencia puede codificar el gen de ADAM6 de ratón unido operativamente con un promotor de ratón con el que se une ADAM6 de ratón en un ratón de tipo silvestre.

Se describe un vector de dirección, que comprende (a) una secuencia de nucleótidos que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleótidos del segmento génico de región variable humano; y (b) una secuencia de nucleótidos que codifica un ADAM6 de ratón u ortólogo u homólogo o fragmento del mismo que es funcional en un ratón.

El vector de dirección puede comprender además un promotor unido operativamente con la secuencia que codifica el ADAM6 de ratón. En una realización específica, el promotor es un promotor de ADAM6 de ratón.

Se describe una construcción de nucleótidos para modificar un locus variable de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón, en donde la construcción comprende al menos un sitio de reconocimiento de recombinasa específica de sitio y una secuencia que codifica una proteína ADAM6 u ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que es funcional en un ratón.

En un aspecto, se proporcionan células de ratón y embriones de ratón, incluyendo pero sin limitación células ES, células pluripotentes y células pluripotentes inducidas, que comprenden modificaciones genéticas como se describe en el presente documento. Se proporcionan células que son XX y células que son XY. También se proporcionan células que comprenden un núcleo que contiene una modificación como se describe en el presente documento, por ejemplo, una modificación introducida en una célula por inyección pronuclear. También se describen células, embriones y ratones que comprenden un gen de ADAM6 introducido de forma vírica, por ejemplo, células, embriones y ratones que comprenden una construcción de transducción que comprende un gen de ADAM6 que es funcional en el ratón.

Se describe una célula de ratón modificada genéticamente, en donde la célula carece de un locus de ADAM6 de ratón endógeno funcional, y la célula comprende una secuencia de nucleótidos ectópica que codifica una proteína ADAM6 de ratón o fragmento funcional de la misma. La célula puede comprender además una modificación de una secuencia de gen variable de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno. La modificación de la secuencia de gen variable de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno puede comprender una supresión seleccionada de una supresión de un segmento génico V_H de ratón, una supresión de un segmento génico D_H de ratón, una supresión de un segmento génico J_H de ratón y una combinación de las mismas. En una realización específica, el ratón comprende un reemplazo de una o más secuencias V_H , D_H y/o J_H de inmunoglobulina de ratón con una secuencia de inmunoglobulina humana. La secuencia de inmunoglobulina humana puede seleccionarse de una V_H humana, una V_L humana, una D_H humana, una J_H humana, una J_L humana y una combinación de las mismas.

En una realización, la célula es una célula totipotente, una célula pluripotente o una célula pluripotente inducida. En una realización específica, la célula es una célula ES de ratón.

En un aspecto, se proporciona un linfocito B de ratón, en donde el linfocito B se aísla del ratón proporcionado, donde el linfocito B de ratón comprende un gen de cadena pesada de inmunoglobulina reordenado, en donde el linfocito B comprende en un cromosoma del linfocito B una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6 u ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho. En una realización, el linfocito B de ratón comprende dos alelos de la secuencia de ácido nucleico.

En una realización, la secuencia de ácido nucleico está en una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un cromosoma de linfocito B) que es contigua con el locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón reordenado.

[Eliminado]

En una realización, el linfocito B de ratón comprende una secuencia de gen variable de inmunoglobulina distinta de ratón reordenado unida operativamente con un gen de región constante de inmunoglobulina de ratón o humano, en donde el linfocito B comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6 u ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho.

En un aspecto, se proporciona una célula somática de ratón, donde la célula se ha aislado del ratón proporcionado, comprendiendo la célula un cromosoma que comprende un locus de cadena pesada de inmunoglobulina modificado y una secuencia de ácido nucleico que codifica un ADAM6 de ratón u ortólogo u homólogo o fragmento del mismo que es funcional en un ratón macho. La secuencia de ácido nucleico está en el mismo cromosoma que el locus de cadena pesada de inmunoglobulina modificado. En una realización, la célula somática comprende una única copia de la secuencia de ácido nucleico. En una realización, la célula somática comprende al menos dos copias de la secuencia de ácido nucleico. En una realización específica, la célula somática es un linfocito B. En una realización específica, la célula es una célula germinal. En una realización específica, la célula es una célula madre.

En un aspecto, se proporciona una célula germinal de ratón, donde la célula se ha aislado del ratón proporcionado, comprendiendo la célula una secuencia de ácido nucleico que codifica un ADAM6 de ratón (u homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo) en un cromosoma de la célula germinal, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica el ADAM6 de ratón (u homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo) está en una posición en el cromosoma que es diferente de una posición en un cromosoma de una célula germinal de ratón de tipo silvestre. La secuencia de ácido nucleico está en un locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón. En una realización, el locus de inmunoglobulina de ratón comprende un reemplazo de al menos una secuencia de inmunoglobulina de ratón con al menos una secuencia de inmunoglobulina humana.

En un aspecto, se proporciona una célula pluripotente, pluripotente inducida o totipotente procedente de un ratón como

se describe en el presente documento. En una realización específica, la célula es una célula madre embrionaria (ES) de ratón.

5 En un aspecto, se proporciona una célula o tejido procedente de un ratón como se describe en el presente documento. En una realización, la célula o tejido procede de bazo, ganglio linfático o médula ósea de un ratón como se describe en el presente documento. En una realización, la célula es un linfocito B. En una realización, la célula es una célula madre embrionaria. En una realización, la célula es una célula germinal.

10 En una realización, el tejido se selecciona de tejido conectivo, muscular, nervioso y epitelial. En una realización específica, el tejido es tejido reproductivo.

15 En una realización, la célula y/o el tejido procedente de un ratón como se describe en el presente documento se aísla para su uso en uno o más ensayos *ex vivo*. En diversas realizaciones, el o los ensayos *ex vivo* incluyen mediciones de propiedades físicas, térmicas, eléctricas, mecánicas u ópticas, un procedimiento quirúrgico, mediciones de interacciones de diferentes tipos tisulares, el desarrollo de técnicas de captura de imágenes o una combinación de los mismos.

20 En un aspecto, se proporciona uso de célula o tejido procedente de un ratón como se describe en el presente documento para realizar un anticuerpo. En un aspecto, se proporciona uso de una célula o tejido procedente de un ratón como se describe en el presente documento para preparar un híbrido o cuadro.

25 En un aspecto, una célula de ratón que comprende un cromosoma o fragmento del mismo de un ratón como se describe en el presente documento. En una realización, la célula de ratón comprende un núcleo de un ratón como se describe en el presente documento. En una realización, la célula de ratón comprende el cromosoma o fragmento del mismo como resultado de una transferencia nuclear.

Se describe un núcleo procedente de un ratón como se describe en el presente documento. El núcleo puede ser de una célula diploide que no es un linfocito B.

30 Se describe una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de inmunoglobulina realizada en un ratón como se describe.

35 Se describe una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina o cadena ligera de inmunoglobulina de un anticuerpo realizado en un ratón como se describe en el presente documento.

Se describe una secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina o cadena ligera de inmunoglobulina que codifica una región variable de un anticuerpo realizado en un ratón como se describe en el presente documento.

40 Se describe un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, Fab, F(ab)₂, scFv) realizado en un ratón como se describe en el presente documento.

45 Se describe un método para preparar un ratón modificado genéticamente que comprende reemplazar uno o más segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina cadena arriba (con respecto a la transcripción de los segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina) de un locus de ADAM6 endógeno del ratón con uno o más segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina humana, y reemplazar uno o más segmentos génicos de inmunoglobulina cadena abajo (con respecto a la transcripción de los segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina) del locus de ADAM6 del ratón con uno o más segmentos génicos de cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina humana. El o los segmentos génicos de inmunoglobulina humana que reemplazan uno o más segmentos génicos de inmunoglobulina endógenos cadena arriba de un locus de ADAM6 endógeno del ratón pueden incluir segmentos génicos V. Los segmentos génicos de inmunoglobulina humana que reemplazan uno o más segmentos génicos de inmunoglobulina endógenos cadena arriba de un locus de ADAM6 endógeno del ratón pueden incluir segmentos génicos V y D. El o los segmentos génicos de inmunoglobulina humana pueden reemplazar uno o más segmentos génicos de inmunoglobulina endógenos cadena abajo de un locus de ADAM6 endógeno del ratón incluyendo segmentos génicos J. El o los segmentos génicos de inmunoglobulina humana pueden reemplazar uno o más segmentos génicos de inmunoglobulina endógenos cadena abajo de un locus de ADAM6 endógeno del ratón incluyendo segmentos génicos D y J. El o los segmentos génicos de inmunoglobulina humana pueden reemplazar uno o más segmentos génicos de inmunoglobulina endógenos cadena abajo de un locus de ADAM6 endógeno del ratón incluyendo segmentos génicos V, D y J.

60 El o los segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina cadena arriba y/o cadena abajo del gen de ADAM6 pueden reemplazarse en una célula pluripotente, pluripotente inducida o totipotente para formar una célula progenitora modificada genéticamente; la célula progenitora modificada genéticamente se introduce en un hospedador; y el hospedador que comprende la célula progenitora modificada genéticamente se gesta para formar un ratón que comprende un genoma procedente de la célula progenitora modificada genéticamente. En una realización, el hospedador es un embrión. El hospedador puede seleccionarse de una premórula de ratón (por ejemplo, estadio de

8 o 4 células), un embrión tetraploide, un agregado de células embrionarias o un blastocisto.

Se describe un método para preparar un ratón modificado genéticamente, que comprende reemplazar una secuencia de nucleótidos de ratón que comprende un segmento génico de inmunoglobulina de ratón y una secuencia de nucleótidos de ADAM6 de ratón (u ortólogo u homólogo o fragmento del mismo funcional en un ratón macho) con una secuencia que comprende un segmento génico de inmunoglobulina humano para formar un primer locus quimérico, insertar después una secuencia que comprende una secuencia que codifica ADAM6 de ratón (o una secuencia que codifica un ortólogo u homólogo o fragmento funcional del mismo) en la secuencia que comprende el segmento génico de inmunoglobulina humana para formar un segundo locus quimérico.

El segundo locus quimérico puede comprender un segmento génico variable de cadena pesada (V_H) de inmunoglobulina humana. El segundo locus quimérico puede comprender un segmento génico variable de cadena ligera (V_L) de inmunoglobulina humana. En una realización específica, el segundo locus quimérico comprende un segmento génico V_H humano o un segmento génico V_L humano unido operativamente con un segmento génico D_H humano y un segmento génico J_H humano. El segundo locus quimérico puede unirse operativamente con un tercer locus quimérico que comprende una secuencia C_H1 humana o una secuencia C_H1 humana y bisagra humana, fusionadas con una secuencia $C_H2 + C_H3$ de ratón.

Se describe el uso de un ratón que comprende una secuencia de nucleótidos ectópica que comprende un locus o secuencia de ADAM6 de ratón para preparar un ratón macho fértil, en donde el uso comprende aparear el ratón que comprende la secuencia de nucleótidos ectópica que comprende el locus o secuencia de ADAM6 de ratón con un ratón que carece de un locus o secuencia de ADAM6 de ratón endógeno funcional y obtener una descendencia que es una hembra capaz de producir descendencia que tiene el locus o secuencia de ADAM6 ectópico o que es un macho que comprende el locus o secuencia de ADAM6 ectópico, y el macho muestra una fertilidad que es aproximadamente igual que la fertilidad mostrada por un ratón macho de tipo silvestre.

En un aspecto, se proporciona uso de un ratón como se describe en el presente documento para realizar una secuencia de nucleótidos de región variable de inmunoglobulina.

En un aspecto, se proporciona uso de un ratón como se describe en el presente documento para realizar un Fab completamente humano o un $F(ab)_2$ completamente humano.

Se describe el uso de un ratón como se describe en el presente documento para realizar una línea celular inmortalizada.

Se describe el uso de un ratón como se describe en este documento para realizar un hibridoma o cuadroma.

Se describe el uso de un ratón como se describe en el presente documento para realizar una biblioteca de fagos que contiene regiones variables de cadena pesada humana y regiones variables de cadena ligera humana.

En un aspecto, se proporciona uso de un ratón como se describe en el presente documento para generar una secuencia de región variable para realizar un anticuerpo humano, que comprende (a) inmunizar a un ratón como se describe en el presente documento con un antígeno de interés, (b) aislar un linfocito del ratón inmunizado de (a), (c) exponer el linfocito a uno o más anticuerpos marcados, (d) identificar un linfocito que es capaz de unirse con el antígeno de interés y (e) amplificar una o más secuencias de ácido nucleico de región variable del linfocito generando de este modo una secuencia de región variable.

En una realización, el linfocito procede del bazo del ratón. En una realización, el linfocito procede de un ganglio linfático del ratón. En una realización, el linfocito procede de la médula ósea del ratón.

En una realización, el anticuerpo marcado es un anticuerpo conjugado con fluoróforo. En una realización, el o los anticuerpos conjugados con fluoróforos se seleccionan de un IgM, un IgG y/o una combinación de los mismos.

En una realización, el linfocito es un linfocito B.

En una realización, la o las secuencias de ácido nucleico de región variable comprenden una secuencia de región variable de cadena pesada. En una realización, la o las secuencias de ácido nucleico de región variable comprenden una secuencia de región variable de cadena ligera. En una realización específica, la secuencia de región variable de cadena ligera es una secuencia de región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina. En una realización, la o las secuencias de ácido nucleico de región variable comprenden una secuencia de región variable de cadena pesada y una cadena ligera κ .

En una realización, se proporciona uso de un ratón como se describe en el presente documento para generar una secuencia de región variable de cadena pesada y una de cadena ligera κ para realizar un anticuerpo humano, que comprende (a) inmunizar a un ratón como se describe en el presente documento con un antígeno de interés, (b) aislar el bazo del ratón inmunizado de (a), (c) exponer linfocitos B del bazo a uno o más anticuerpos marcados, (d) identificar

un linfocito B de (c) que es capaz de unirse con el antígeno de interés, y (e) amplificar una secuencia de ácido nucleico de región variable de cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico de región variable de cadena ligera κ del linfocito B generando de este modo las secuencias de región variable de cadena pesada y cadena ligera κ .

En una realización, se proporciona uso de un ratón como se describe en el presente documento para generar una secuencia de región variable de cadena pesada y una de cadena ligera κ para realizar un anticuerpo humano, que comprende (a) inmunizar un ratón como se describe en el presente documento con un antígeno de interés, (b) aislar uno o más ganglios linfáticos del ratón inmunizado de (a), (c) exponer linfocitos B del o los ganglios linfáticos a uno o más anticuerpos marcados, (d) identificar un linfocito B de (c) que es capaz de unirse con el antígeno de interés y (e) amplificar una secuencia de ácido nucleico de región variable de cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico de región variable de cadena ligera κ del linfocito B generando de este modo las secuencias de región variable de cadena pesada y cadena ligera κ .

En una realización, se proporciona uso de un ratón como se describe en el presente documento para generar una secuencia de región variable de cadena pesada y una de cadena ligera κ para realizar un anticuerpo humano, que comprende (a) inmunizar un ratón como se describe en el presente documento con un antígeno de interés, (b) aislar médula ósea del ratón inmunizado de (a), (c) exponer linfocitos B de la médula ósea a uno o más anticuerpos marcados, (d) identificar un linfocito B de (c) que es capaz de unirse con el antígeno de interés y (e) amplificar una secuencia de ácido nucleico de región variable de cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico de región variable de cadena ligera κ del linfocito B generando de este modo las secuencias de región variable de cadena pesada y cadena ligera κ . En diversas realizaciones, el o los anticuerpos marcados se seleccionan de un IgM, un IgG, y/o una combinación de los mismos.

En diversas realizaciones, se proporciona uso de un ratón como se describe en el presente documento para generar una secuencia de región variable de cadena pesada y ligera κ para realizar un anticuerpo humano, que comprende además fusionar las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera amplificadas con secuencias de región constante de cadena pesada y ligera humanas, expresar las secuencias de cadena pesada y ligera fusionadas en una célula y recuperan las secuencias de cadena pesada y ligera expresadas generando de este modo un anticuerpo humano.

En diversas realizaciones, las regiones constantes de cadena pesada humana se seleccionan de IgM, IgD, IgA, IgE e IgG. En diversas realizaciones específicas, la IgG se selecciona de una IgG1, una IgG2, una IgG3 y una IgG4. En diversas realizaciones, la región constante de cadena pesada humana comprende una C_H1 , una bisagra, una C_H2 , una C_H3 , una C_H4 , o una combinación de las mismas. En diversas realizaciones, la región constante de cadena ligera es una región constante κ de inmunoglobulina. En diversas realizaciones, la célula se selecciona de una célula HeLa, una célula DU145, una célula Lncap, una célula MCF-7, una célula MDA-MB-438, una célula PC3, una célula T47D, una célula THP-1, una célula U87, una célula SHSY5Y (neuroblastoma humano), una célula Saos-2, una célula Vero, una célula CHO, una célula GH3, una célula PC12, una célula retiniana humana (por ejemplo, una célula PER.C6™) y una célula MC3T3. En una realización específica, la célula es una célula CHO.

En un aspecto, se proporciona un método para generar un anticuerpo inverso quimérico de roedor-humano contra un antígeno de interés, que comprende las etapas de inmunizar un ratón como se describe en el presente documento con el antígeno, aislar al menos una célula del ratón que produce un anticuerpo inverso quimérico de ratón-humano específico contra el antígeno, cultivar al menos una célula que produce el anticuerpo inverso quimérico de ratón-humano específico contra el antígeno y obtener dicho anticuerpo.

En una realización, el anticuerpo inverso quimérico de ratón-humano comprende un dominio variable de cadena pesada humana fusionado con un gen constante de cadena pesada de ratón o rata, y un dominio variable de cadena ligera humano fusionado con un gen constante de cadena ligera de ratón o rata o humano.

En una realización, se realiza cultivo de al menos una célula que produce el anticuerpo inverso quimérico de roedor-humano específico contra el antígeno en al menos una célula de hibridoma generada a partir de la al menos una célula aislada del ratón.

En un aspecto, se proporciona un método para generar un anticuerpo completamente humano específico contra un antígeno de interés, que comprende las etapas de inmunizar un ratón como se describe en el presente documento con el antígeno, aislar al menos una célula del ratón que produce un anticuerpo inverso quimérico de roedor-humano específico contra el antígeno, generar al menos una célula que produce un anticuerpo completamente humano procedente del anticuerpo inverso quimérico de roedor-humano específico contra el antígeno y cultivar al menos una célula que produce el anticuerpo completamente humano, y obtener dicho anticuerpo completamente humano.

En diversas realizaciones, la al menos una célula aislada del ratón que produce un anticuerpo inverso quimérico de roedor-humano específico contra el antígeno es un esplenocito o un linfocito B.

En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
En diversas realizaciones, se lleva a cabo inmunización con el antígeno de interés con proteína, ADN, una combinación

de ADN y proteína, o células que expresan el antígeno.

En un aspecto, se proporciona uso de un ratón como se describe en el presente documento para realizar una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de inmunoglobulina o fragmento de la misma. En una realización, la secuencia de ácido nucleico se usa para realizar un anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno del mismo. En una realización, el ratón se usa para realizar una proteína de unión a antígeno seleccionada de un anticuerpo, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico), un scFv, un scFv biespecífico, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un V-NAR, un V_{HH}, un V_L, un F(ab), un F(ab)₂, un DVD (es decir, proteína de unión a antígeno de dominio variable doble), un SVD (es decir, proteína de unión a antígeno de dominio variable individual) o un agente de interacción de linfocito T biespecífico (BiTE).

Se describe uso de un ratón como se describe en el presente documento para introducir una secuencia de ADAM6 ectópica en un ratón que carece de una secuencia de ADAM6 de ratón endógena funcional en donde el uso comprende aparear un ratón como se describe en el presente documento con el ratón que carece de la secuencia de ADAM6 de ratón endógena funcional.

Se describe el uso de material genético de un ratón como se describe en el presente documento para preparar un ratón que tiene una secuencia de ADAM6 ectópica. El uso puede comprender transferencia nuclear usando un núcleo de una célula de un ratón como se describe en el presente documento. El uso puede comprender clonar una célula de un ratón como se describe en el presente documento para producir un animal procedente de la célula. El uso puede comprender emplear un espermatozoide o un óvulo de un ratón como se describe en el presente documento en un proceso para preparar un ratón que comprende la secuencia de ADAM6 ectópica.

Se describe un método para realizar un ratón macho fértil que comprende un locus de cadena pesada de inmunoglobulina modificado, que comprende fertilizar una primera célula germinal de ratón que comprende una modificación de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno con una segunda célula germinal de ratón que comprende un gen de ADAM6 u ortólogo u homólogo o fragmento del mismo que es funcional en un ratón macho; formar una célula fertilizada; permitir que la célula fertilizada se desarrolle a un embrión; y gestar el embrión en una sustituta para obtener un ratón.

La fertilización puede conseguirse apareando un ratón macho y un ratón hembra. El ratón hembra puede comprender el gen de ADAM6 u ortólogo u homólogo o fragmento del mismo. El ratón macho puede comprender el gen de ADAM6 u ortólogo u homólogo o fragmento del mismo.

Se describe el uso de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6 de ratón o un ortólogo u homólogo de la misma o un fragmento funcional de la proteína ADAM6 correspondiente para restaurar o potenciar la fertilidad de un ratón que tiene un genoma que comprende una modificación de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina, en donde la modificación reduce o elimina la función de ADAM6 endógena.

La secuencia de ácido nucleico está integrada en el genoma del ratón en un locus de inmunoglobulina endógeno que es un locus de cadena pesada.

Se describe en el presente documento el uso del ratón como se describe en el presente documento para la fabricación de un medicamento (por ejemplo, una proteína de unión a antígeno), o para la fabricación de una secuencia que codifica una secuencia variable de un medicamento (por ejemplo, una proteína de unión a antígeno), para el tratamiento de una enfermedad o trastorno humano.

Se describe una célula de ratón modificada genéticamente, en donde la célula es incapaz de expresar una cadena pesada que comprende segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos reordenados, y la célula comprende un gen de ADAM6 funcional que codifica una proteína ADAM6 de ratón o fragmento funcional de la misma. La célula puede comprender además una inserción de segmentos génicos de inmunoglobulina humana. Los segmentos génicos de inmunoglobulina humana pueden ser segmentos génicos de cadena pesada que se unen operativamente con regiones constantes de cadena pesada de ratón de modo que tras el reordenamiento codifican una cadena pesada funcional de un anticuerpo que comprende una región variable humana.

Se describen ratones, embriones, células, tejidos modificados genéticamente, así como construcciones de ácido nucleico para modificar los ratones, y métodos y composiciones para realizarlos y usarlos. También se describen ratones y células que generan regiones variables lambda (λ) (humanas o no humanas) en el contexto de una cadena ligera kappa (κ), en donde los ratones y células comprenden una modificación de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada que elimina o reduce la actividad de una proteína ADAM6 u homólogo u ortólogo de la misma, en donde los ratones comprenden además una modificación genética que restaura completamente o en parte la actividad de ADAM6 (o la actividad del homólogo u ortólogo de la misma). También se describen ratones que son fértiles y expresan un afín de dominio variable λ humano con un dominio variable de cadena pesada humano, en donde el dominio variable λ humano se expresa en el ratón contiguo con una región constante κ de ratón, y en diversas realizaciones la región constante κ es una región constante endógena (de ratón). También se describen ratones y células que generan regiones variables λ humanas en el contexto de una cadena ligera κ de ratón, por ejemplo, de un

locus de cadena ligera de ratón endógeno. También se describen métodos para realizar anticuerpos que comprenden regiones variables lambda. También se describen métodos para seleccionar cadenas pesadas que se expresan con regiones variables lambda afines.

- 5 Se describen proteínas de unión a antígeno quiméricas y humanas (por ejemplo, anticuerpos) y ácidos nucleicos que las codifican, que comprenden regiones variables mutadas de forma somática, incluyendo anticuerpos que tienen cadenas ligeras que comprenden un dominio variable procedente de un segmento génico V λ humano y uno J λ humano fusionado con un dominio constante de cadena ligera κ de ratón.
- 10 Se describe un ratón que expresa una secuencia de región variable λ humana en una cadena ligera que comprende una región constante κ . Se describe un ratón que expresa a partir de un locus de cadena ligera de ratón endógeno una cadena ligera que comprende una secuencia de región variable λ humana. Se describe un ratón que comprende un gen de cadena ligera reordenado que comprende una secuencia variable λ humana ligada a una secuencia constante κ de ratón.
- 15 Se describe un ratón modificado genéticamente, en donde el ratón comprende un segmento génico variable de cadena ligera λ humano no reordenado (hV λ) y un segmento génico de unión λ humano (hJ λ). Los hV λ y hJ λ no reordenados están en un locus de cadena ligera κ de ratón. El ratón puede ser capaz de realizar una inmunoglobulina que comprende una cadena ligera que procede de una secuencia de hV λ no reordenada y una secuencia hJ λ y una
- 20 secuencia de ácido nucleico de región constante de cadena ligera κ de ratón (C κ). También se describen métodos y composiciones para realizar y usar ratones modificados genéticamente. Se describen anticuerpos que comprenden (a) un dominio variable de cadena pesada humana (hV μ) fusionado con una región constante de cadena pesada de ratón y (b) un V μ humano fusionado con un dominio C κ de ratón; incluyendo en donde uno o más de los dominios variables se mutan de forma somática, por ejemplo, durante selección de anticuerpos o células inmunitarias en un
- 25 ratón de la invención. Los hV λ no reordenado y hJ λ no reordenado se unen operativamente con una región constante κ de ratón (C κ).
- Se describe un ratón que comprende en su línea germinal, en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno, una secuencia de región variable de cadena ligera λ humana, en donde la secuencia de región variable lambda humana se expresa en una cadena ligera que comprende una secuencia génica de región constante de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón.
- 30 [Eliminado]
- 35 En una realización, el ratón carece de una secuencia variable de cadena ligera endógena en el locus de cadena ligera de ratón endógeno.
- En una realización, todos o sustancialmente todos los segmentos génicos de región variable de cadena ligera de ratón endógenos se reemplazan con uno o más segmentos génicos de región variable λ humanos.
- 40 En una realización, la secuencia de región variable de cadena ligera λ humana comprende una secuencia J λ humana. En una realización, la secuencia J λ humana se selecciona del grupo que consiste en J λ 1, J λ 2, J λ 3, J λ 7 y una combinación de las mismas.
- 45 En una realización, la secuencia de región variable de cadena ligera λ humana comprende un fragmento del grupo A del locus de cadena ligera humano. En una realización específica, el fragmento del grupo A del locus de cadena ligera λ humano se extiende desde hV λ 3-27 hasta hV λ 3-1.
- En una realización, la secuencia de región variable de cadena ligera λ humana comprende un fragmento del grupo B de locus de cadena ligera humano. En una realización específica, el fragmento del grupo B del locus de cadena ligera λ humano se extiende desde hV λ 5-52 hasta hV λ 1-40.
- 50 En una realización, la secuencia de región variable de cadena ligera λ humana comprende un fragmento genómico del grupo A y un fragmento genómico del grupo B. En una realización, la secuencia de región variable de cadena ligera λ humana comprende al menos un segmento génico del grupo A y al menos un segmento génico del grupo B.
- 55 En una realización, más del 10 % del repertorio sin exposición previa de cadena ligera del ratón procede de al menos dos segmentos génicos hV λ seleccionados de 2-8, 2-23, 1-40, 5-45 y 9-49. En una realización, más del 20 % del repertorio sin exposición previa de cadena ligera del ratón procede de al menos tres segmentos génicos hV λ seleccionados de 2-8, 2-23, 1-40, 5-45 y 9-49. En una realización, más del 30 % del repertorio sin exposición previa de cadena ligera del ratón procede de al menos cuatro segmentos génicos hV λ seleccionados de 2-8, 2-23, 1-40, 5-45 y 9-49.
- 60 Se describe un ratón que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una secuencia variable λ humana fusionada con una región constante κ de ratón, en donde el ratón muestra una relación de uso de κ con respecto a uso de λ de aproximadamente 1:1.
- 65

La cadena ligera de inmunoglobulina se expresa a partir de un locus de cadena ligera de ratón endógeno.

5 Se describe un ratón que comprende una secuencia de región variable de cadena ligera λ ($V\lambda$) y al menos una secuencia J (J), contigua con una secuencia de región constante de cadena ligera κ de ratón.

El ratón puede carecer de un segmento génico $V\kappa$ de ratón y/o $J\kappa$ de ratón funcional.

10 El $V\lambda$ es un $V\lambda$ humano ($hV\lambda$), y el J es un $J\lambda$ humano ($hJ\lambda$). El $hV\lambda$ y el $hJ\lambda$ son segmentos génicos no reordenados.

En una realización, el ratón comprende una pluralidad de segmentos génicos $hV\lambda$ humanos no reordenados y al menos un segmento génico $hJ\lambda$ humano. En una realización específica, la pluralidad de segmentos génicos $hV\lambda$ no reordenados son de al menos 12 segmentos génicos, al menos 28 segmentos génicos o al menos 40 segmentos génicos.

15 En una realización, el al menos un segmento génico $hJ\lambda$ se selecciona del grupo que consiste en $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$, $J\lambda 7$ y una combinación de los mismos.

20 En una realización, un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno se suprime totalmente o en parte.

La secuencia de la región constante de cadena ligera κ del ratón está en un locus de cadena ligera de κ de ratón endógeno.

25 En una realización, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 45 % de los linfocitos B del ratón expresan un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera λ ($V\lambda$) humano y un dominio constante de cadena ligera κ ($C\kappa$) de ratón.

30 En una realización, el dominio variable λ humano procede de una secuencia $hV\lambda/hJ\lambda$ reordenada seleccionada del grupo que consiste en 3-1/1, 3-1/7, 4-3/1, 4-3/7, 2-8/1, 3-9/1, 3-10/1, 3-10/3, 3-10/7, 2-14/1, 3-19/1, 2-23/1, 3-25/1, 1-40/1, 1-40/2, 1-40/3, 1-40/7, 7-43/1, 7-43/3, 1-44/1, 1-44/7, 5-45/1, 5-45/2, 5-45/7, 7-46/1, 7-46/2, 7-46/7, 9-49/1, 9-49/2, 9-49/7 y 1-51/1.

35 En una realización, el ratón comprende además una región intergénica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana de un locus de cadena ligera κ humano, en donde la región intergénica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana es contigua con la secuencia de $V\lambda$ y la secuencia de J . En una realización específica, la región intergénica de $V\kappa$ - $J\kappa$ humana se sitúa entre la secuencia de $V\lambda$ y la secuencia de J .

40 Se describe un ratón que comprende (a) de al menos 12 a al menos 40 segmentos génicos de región variable de cadena ligera λ humanos reordenados y al menos un segmento génico $J\lambda$ humano en un locus de cadena ligera de ratón endógeno; (b) una secuencia intergénica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana localizada entre los al menos 12 a al menos 40 segmentos génicos de región variable de cadena ligera humanos y la al menos una secuencia $J\lambda$ humana; en donde el ratón expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende un dominio $V\lambda$ humano y un dominio $C\kappa$ de ratón.

45 Se describe un ratón que expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia variable λ y una secuencia constante κ de ratón.

En una realización, el ratón muestra una relación de uso de κ con respecto a uso de λ de aproximadamente 1:1.

50 En una realización, una población de linfocitos B inmaduros obtenidos de médula ósea del ratón muestra una relación de uso de κ con respecto a uso de λ de aproximadamente 1:1.

Se describe un ratón modificado genéticamente, en donde el ratón comprende un segmento génico $V\lambda$ y un $J\lambda$ de inmunoglobulina no reordenado ligado a un locus de cadena ligera κ de ratón que comprende un gen de $C\kappa$ de ratón.

55 Los segmentos génicos $V\lambda$ y $J\lambda$ son segmentos génicos humanos.

El locus de cadena ligera de ratón endógeno es un locus de cadena ligera κ .

60 Los segmentos génicos $V\lambda$ y $J\lambda$ no reordenados están en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno.

[Eliminado]

65 En una realización, el ratón comprende además un reemplazo de uno o más segmentos génicos V , D y/o J de cadena pesada con uno o más segmentos génicos V , D y/o J humanos en un locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón endógeno.

En una realización, el ratón comprende un segmento génico Vλ y un Jλ de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno que comprende un gen de Cκ de ratón.

- 5 En una realización, el ratón comprende además un segmento génico variable de cadena ligera λ de inmunoglobulina humano (Vλ) y un segmento génico de unión λ (Jλ) en un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno que comprende un gen de Cλ de ratón.

El locus de gen variable de cadena ligera (el "locus V_L") comprende al menos un segmento génico Vλ humano (hVλ).

- 10 El locus V_L comprende al menos un segmento génico Jλ humano (hJλ). En otra realización, el locus V_L comprende hasta cuatro segmentos génicos hJλ. En una realización, el locus V_L comprende una secuencia contigua que comprende secuencia genómica λ humana y κ humana.

El locus del gen variable de cadena ligera κ (el "locus κ") comprende al menos un segmento génico Vλ humano (hVλ).

- 15 El locus κ comprende al menos un segmento génico Jλ humano (hJλ). En una realización, el locus κ comprende hasta cuatro segmentos génicos hJλ. En una realización, el locus κ comprende al menos un hVλ humano y al menos un hJλ humano, y carece o sustancialmente carece de un segmento génico de región Vκ funcional y carece o sustancialmente carece de un segmento génico de región Jκ funcional. En una realización, el ratón no comprende ningún segmento génico de región Vκ funcional. En una realización, el ratón no comprende ningún segmento génico de región Jκ funcional.

En una realización, el locus de gen variable de cadena ligera λ (el "locus λ") comprende al menos un segmento génico hVλ. En una realización, el locus λ comprende al menos un segmento génico Jλ humano (hJλ). En otra realización, el locus λ comprende hasta cuatro segmentos génicos hJλ.

- 25 En una realización, el locus V_L comprende una pluralidad de hVλ. En una realización, la pluralidad de hVλ se seleccionan para dar como resultado la expresión de un repertorio de regiones variables de cadena ligera λ que refleja aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 % o aproximadamente 90 % o más del uso de Vλ observado en un ser humano. En una realización, el locus V_L comprende segmentos génicos hVλ 1-40, 1-44, 2-8, 2-14, 3-21, y una combinación de los mismos.

En una realización, los hVλ incluyen 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11 y 3-12. En una realización específica, el locus V_L comprende una secuencia contigua del locus de cadena ligera λ humano que abarca de Vλ3-12 a Vλ3-1. En una realización, el locus V_L comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 hVλ. En una realización específica, los hVλ incluyen 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11 y 3-12. En una realización específica, el locus V_L comprende una secuencia contigua del locus λ humano que abarca de Vλ3-12 a Vλ3-1. En una realización, el locus V_L está en el locus κ endógeno. En una realización específica, el locus V_L está en el locus κ endógeno y el locus de cadena ligera λ endógeno se suprime en parte o completamente. En una realización, el locus V_L está en el locus λ endógeno. En una realización específica, el locus V_L está en el locus λ endógeno y el locus κ endógeno se suprime en parte o completamente.

- 45 En una realización, el locus V_L comprende de 13 a 28 o más hVλ. En una realización específica, los hVλ incluyen 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25 y 3-27. En una realización específica, el locus κ comprende una secuencia contigua del locus λ humano que abarca de Vλ3-27 a Vλ3-1. En una realización, el locus V_L está en el locus κ endógeno. En una realización específica, el locus V_L está en el locus κ endógeno y el locus de cadena ligera λ endógeno se suprime en parte o completamente. En otra realización, el locus V_L está en el locus λ endógeno. En una realización específica, el locus V_L está en el locus λ endógeno y el locus κ endógeno se suprime en parte o completamente.

En una realización, el locus V_L comprende de 29 a 40 hVλ. En una realización específica, el locus κ comprende una secuencia contigua del locus λ humano que abarca de Vλ3-29 a Vλ3-1, y una secuencia contigua del locus λ humano que abarca de Vλ5-52 a Vλ1-40. En una realización específica, toda o sustancialmente toda la secuencia entre hVλ1-40 y hVλ3-29 en el ratón modificado genéticamente consiste esencialmente en una secuencia λ humana de aproximadamente 959 pb hallada en la naturaleza (por ejemplo, en la población humana) cadena abajo del segmento génico hVλ1-40 (cadena abajo de la parte no traducida 3'), un sitio de enzimas de restricción (por ejemplo, PI-SceI), seguido de una secuencia λ humana de aproximadamente 3.431 pb cadena arriba del segmento génico hVλ3-29 hallado en la naturaleza. En una realización, el locus V_L está en el locus κ de ratón endógeno. En una realización específica, el locus V_L está en el locus κ de ratón endógeno y el locus de cadena ligera λ de ratón endógeno se suprime en parte o completamente. En otra realización, el locus V_L está en el locus λ de ratón endógeno. En una realización específica, el locus V_L está en el locus λ de ratón endógeno y el locus κ de ratón endógeno se suprime en parte o completamente.

- 65 El locus V_L comprende al menos una hJλ. En una realización, el locus V_L comprende una pluralidad de hJλ. En una realización, el locus V_L comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6 o 7 hJλ. En una realización específica, el locus V_L comprende cuatro hJλ. En una realización específica, los cuatro hJλ son hJλ1, hJλ2, hJλ3 y hJλ7. En una realización, el locus V_L

es un locus κ . En una realización específica, el locus V_L está en el locus κ endógeno y el locus de cadena ligera λ endógeno se suprime en parte o completamente. En una realización, el locus V_L comprende una $hJ\lambda$. En una realización específica, el $hJ\lambda$ es $hJ\lambda 1$. En una realización, el locus V_L está en el locus κ endógeno. En una realización específica, el locus V_L está en el locus κ endógeno y el locus de cadena ligera λ endógeno se suprime en parte o completamente. En otra realización, el locus V_L está en el locus λ endógeno. En una realización específica, el locus V_L está en el locus λ endógeno y el locus κ endógeno se suprime en parte o completamente.

El locus V_k comprende al menos un gen de $hV\lambda$, al menos uno de $hJ\lambda$ y al menos uno de C_k de ratón.

En una realización, el ratón comprende un reemplazo en el locus κ de ratón endógeno de segmentos génicos V_k de ratón endógenos con uno o más segmentos génicos $hV\lambda$, en donde los segmentos génicos $hV\lambda$ están unidos operativamente con un gen de región C_k de ratón endógeno, de modo que el ratón reordena los segmentos génicos $V\lambda$ humanos y expresa una cadena ligera de inmunoglobulina quimérica inversa que comprende un dominio $V\lambda$ humano y un C_k de ratón. En una realización, 90-100 % de los segmentos génicos V_k de ratón no reordenados se reemplazan con al menos un segmento génico $hV\lambda$ no reordenado. En una realización específica, todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_k de ratón endógeno se reemplazan con al menos un segmento génico $hV\lambda$ no reordenado. En una realización, el reemplazo es con al menos 12, al menos 28 o al menos 40 segmentos génicos $hV\lambda$ no reordenados. En una realización, el reemplazo es con al menos 7 segmentos génicos $hV\lambda$ no reordenados, al menos 16 segmentos génicos $hV\lambda$ no reordenados funcionales o al menos 27 segmentos génicos $hV\lambda$ no reordenados funcionales. En una realización, el ratón comprende un reemplazo de todos los segmentos génicos J_k de ratón con al menos un segmento génico $hJ\lambda$ no reordenado. En una realización, el al menos un segmento génico $hJ\lambda$ no reordenado se selecciona de $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$, $J\lambda 4$, $J\lambda 5$, $J\lambda 6$, $J\lambda 7$ y una combinación de los mismos. En una realización específica, el o los segmentos génicos $hV\lambda$ se seleccionan de un segmento génico $hV\lambda$ 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, 3-12, 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, 3-27, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 5-48, 9-49, 1-50, 1-51 y 5-52, y una combinación de los mismos. En una realización específica, el al menos un segmento génico $hJ\lambda$ no reordenado se selecciona de $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$, $J\lambda 7$ y una combinación de los mismos.

En una realización, el ratón comprende además un reemplazo de segmentos génicos $V\lambda$ de ratón endógenos en el locus λ de ratón endógeno con uno o más segmentos génicos $V\lambda$ humanos en el locus λ de ratón endógeno, en donde los segmentos génicos $hV\lambda$ están unidos operativamente con un gen de región $C\lambda$ de ratón, de modo que el ratón reordena los segmentos génicos $hV\lambda$ y expresa una cadena ligera de inmunoglobulina quimérica inversa que comprende un dominio $hV\lambda$ y un $C\lambda$ de ratón. En una realización específica, el gen de $C\lambda$ de ratón es $C\lambda 2$. En una realización específica, el gen de $C\lambda$ de ratón es al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % idéntico a $C\lambda 2$ de ratón. En una realización, 90-100 % de los segmentos génicos $V\lambda$ de ratón no reordenados se reemplazan con al menos un segmento génico $hV\lambda$ no reordenado. En una realización específica, todos o sustancialmente todos los segmentos génicos $V\lambda$ de ratón endógenos se reemplazan con al menos un segmento génico $hV\lambda$ no reordenado. En una realización, el reemplazo es con al menos 12, al menos 28, o al menos 40 segmentos génicos $hV\lambda$ no reordenados. En una realización, el reemplazo es con al menos 7 segmentos génicos $hV\lambda$ no reordenados funcionales, al menos 16 segmentos génicos $hV\lambda$ no reordenados funcionales o al menos 27 segmentos génicos $hV\lambda$ no reordenados funcionales. En una realización, el ratón comprende un reemplazo de todos los segmentos génicos $J\lambda$ de ratón con al menos un segmento génico $hJ\lambda$ no reordenado. En una realización, el al menos un segmento génico $hJ\lambda$ no reordenado se selecciona de $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$, $J\lambda 4$, $J\lambda 5$, $J\lambda 6$, $J\lambda 7$ y una combinación de los mismos. En una realización específica, el o los segmentos génicos $hV\lambda$ se seleccionan de un segmento génico 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, 3-12, 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, 3-27, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 5-48, 9-49, 1-50, 1-51 y 5-52, y una combinación de los mismos. En una realización específica, el al menos un segmento génico $hJ\lambda$ no reordenado se selecciona de $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$, $J\lambda 7$ y una combinación de los mismos.

En un aspecto, se proporciona un ratón modificado genéticamente que comprende una secuencia de región intergénica V_k - J_k humana localizada en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno.

En una realización, la secuencia de región intergénica V_k - J_k humana está en un locus de cadena ligera κ endógeno de un ratón que comprende un segmento génico $hV\lambda$ y $hJ\lambda$, y la secuencia de región intergénica V_k - J_k humana se dispone entre los segmentos génicos $hV\lambda$ y $hJ\lambda$. En una realización específica, los segmentos génicos $hV\lambda$ y $hJ\lambda$ son capaces de recombinar para formar un dominio variable de cadena ligera λ humano funcional en el ratón.

En una realización, se proporciona un ratón que comprende una pluralidad de $hV\lambda$ y uno o más $hJ\lambda$, y la secuencia de región intergénica V_k - J_k humana se dispone, con respecto a la transcripción, cadena abajo de la secuencia $hV\lambda$ próxima o más 3' y cadena abajo o 5' de la primera secuencia $hJ\lambda$.

En una realización, la región intergénica V_k - J_k humana es una región localizada aproximadamente 130 pb cadena abajo o 3' de un segmento génico $V_k 4-1$ humano, aproximadamente 130 pb cadena abajo de la región no traducida 3' del segmento génico $V_k 4-1$ humano, y abarca hasta aproximadamente 600 pb cadena arriba o 5' de un segmento génico $J_k 1$ humano. En una realización específica, la región intergénica V_k - J_k humana es de aproximadamente 22,8 kb de tamaño. En una realización, la región intergénica V_k - J_k es de aproximadamente 90 % o más, 91 % o más, 92 % o más, 93 % o más, 94 % o más o aproximadamente 95 % o más idéntica a una región intergénica V_k - J_k humana.

que se extiende desde el final de la región no traducida 3' de un segmento génico Vκ4-1 humano a aproximadamente 600 pb cadena arriba de un segmento génico Jκ1 humano. En una realización, la región intergénica Vκ-Jκ comprende la SEQ ID NO: 158. En una realización específica, la región intergénica Vκ-Jκ comprende un fragmento funcional de la SEQ ID NO: 158. En una realización específica, la región intergénica Vκ-Jκ es la SEQ ID NO: 158.

Se describe un animal no humano, una célula no humana (por ejemplo, una célula ES o una célula pluripotente), un embrión no humano, o un tejido no humano que comprenden la secuencia de región intergénica Vκ-Jκ humana enumerada, en donde la secuencia de región intergénica es ectópica. La secuencia ectópica puede situarse en un locus de inmunoglobulina no humano endógeno humanizado. El animal no humano es un ratón.

Se describe una construcción de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de región intergénica Vκ-Jκ humana enumerada. La construcción de ácido nucleico puede comprender ramas de dirección para dirigir la secuencia de región intergénica Vκ-Jκ humana a un locus de cadena ligera de ratón. El locus de cadena ligera de ratón puede ser un locus κ. Las ramas de dirección pueden dirigir la región intergénica Vκ-Jκ humana a un locus κ de ratón endógeno modificado, en donde la dirección es a una posición entre una secuencia hVλ y una secuencia hJλ.

Se describe un ratón modificado genéticamente, en donde el ratón no comprende más de dos alelos de cadena ligera, en donde los alelos de cadena ligera comprenden (a) un segmento génico Vλ y un Jλ humano de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno que comprende un gen de Cκ de ratón; y (b) un segmento génico Vλ y un Jλ de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera de ratón endógeno que comprende un gen de C_L de ratón.

En otra realización, el locus de cadena ligera de ratón endógeno que comprende un gen de C_L de ratón es un locus λ.

Los no más de dos alelos de cadena ligera pueden seleccionarse de un alelo κ y un alelo λ, dos alelos κ y dos alelos λ. En una realización específica, uno de los dos alelos de cadena ligera es un alelo λ que comprende un gen de Cλ2.

El ratón puede comprender un locus de cadena ligera de inmunoglobulina funcional y un locus de cadena ligera no funcional, en donde el locus de cadena ligera funcional comprende un segmento génico Vλ y un Jλ humano de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno que comprende un gen de Cκ de ratón.

También se desvela un ratón que comprende un locus de cadena ligera de inmunoglobulina funcional y un locus de cadena ligera no funcional, en donde el locus de cadena ligera funcional comprende un segmento génico Vλ y un Jλ humano de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno que comprende un gen de Cλ de ratón. El gen de Cλ puede ser Cλ2. El gen de Cλ de ratón puede ser al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idéntico a Cλ2 del ratón.

El ratón comprende además al menos un alelo de cadena pesada de inmunoglobulina. En una realización, el al menos un alelo de cadena pesada de inmunoglobulina comprende un segmento génico V_H humano, un segmento génico D_H humano y un segmento génico J_H humano en un locus de cadena pesada de ratón endógeno que comprende un gen de cadena pesada humano que expresa una cadena pesada humana/de ratón. En una realización específica el ratón comprende dos alelos de cadena pesada de inmunoglobulina, y el ratón expresa una cadena pesada humana/de ratón.

En una realización, el ratón comprende un primer alelo de cadena ligera que comprende un hVκ no reordenado y un hJκ no reordenado, en un locus κ de ratón endógeno que comprende un gen de Cκ endógeno; y un segundo alelo de cadena ligera que comprende un hVλ no reordenado y un hJλ no reordenado, en un locus κ de ratón endógeno que comprende un gen Cκ endógeno. En una realización específica, el primer y el segundo alelos de cadena ligera son los únicos alelos de cadena ligera funcionales del ratón modificado genéticamente. En una realización específica, el ratón comprende un locus λ no funcional. En una realización, el ratón modificado genéticamente no expresa una cadena ligera que comprende una región constante λ.

En una realización, el ratón comprende un primer alelo de cadena ligera que comprende un hVκ no reordenado y un hJκ no reordenado, en un locus κ de ratón endógeno que comprende un gen Cκ endógeno; y un segundo alelo de cadena ligera que comprende un hVλ no reordenado y un hJλ no reordenado, en un locus λ de ratón endógeno que comprende un gen de Cλ endógeno. En una realización específica, el primer y el segundo alelos de cadena ligera son los únicos alelos de cadena ligera funcionales del ratón modificado genéticamente. En una realización, el gen de Cλ endógeno es Cλ2. En una realización específica, el gen de Cλ de ratón es al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idéntico a Cλ2 de ratón.

En una realización, el ratón comprende seis alelos de inmunoglobulina, en donde el primer alelo comprende un segmento génico Vλ y Jλ de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno que comprende un gen de Cκ de ratón, el segundo comprende un segmento génico Vκ y Jκ de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno que comprende un gen de Cκ de ratón, el tercero comprende un segmento génico Vλ y Jλ de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno que comprende un gen de Cλ de ratón, el cuarto y el quinto comprenden cada uno de forma independiente

un segmento génico V_H y D_H y J_H no reordenados en un locus de cadena pesada de ratón endógeno que comprende un gen de cadena pesada de ratón, y el sexto comprende (a) un segmento génico V_λ y J_λ de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno que comprende un gen de C_λ de ratón, (b) un locus λ que no es funcional o (c) una supresión completamente o en parte del locus λ .

En una realización, el primer alelo comprende un hV_λ y hJ_λ no reordenado. En una realización, el segundo alelo comprende un hV_k y hJ_k no reordenado. En una realización, el tercer alelo comprende un hV_λ y hJ_λ no reordenado. En una realización, el cuarto y quinto comprenden cada uno de forma independiente un hV_H y hD_H y hJ_H no reordenados. En una realización, el sexto alelo comprende un locus λ de ratón endógeno que se suprime completamente o en parte.

En una realización, el ratón comprende seis alelos de inmunoglobulina, en donde el primer alelo comprende un segmento génico V_λ y J_λ de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno que comprende un gen de C_λ de ratón, el segundo comprende un segmento génico V_λ y J_λ de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno que comprende un gen de C_λ de ratón, el tercero comprende un segmento génico V_k y J_k de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno que comprende un gen de C_k de ratón, el cuarto y el quinto comprenden cada uno de forma independiente un segmento génico V_H y D_H y J_H no reordenado en un locus de cadena pesada de ratón endógeno que comprende un gen de cadena pesada de ratón y el sexto comprende (a) un segmento génico V_k y J_k de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno que comprende un gen de C_k de ratón, (b) un locus κ que no es funcional o (c) una supresión de uno o más elementos del locus κ .

En una realización, el primer alelo comprende un segmento génico hV_λ y hJ_λ no reordenado. En una realización, el segundo alelo comprende un segmento génico hV_λ y hJ_λ no reordenado. En una realización, el tercer alelo comprende un segmento génico hV_k y hJ_k no reordenado. En una realización, el cuarto y quinto comprenden cada uno de forma independiente un segmento génico hV_H y hD_H y hJ_H no reordenado. En una realización, el sexto alelo comprende un locus κ de ratón endógeno que está funcionalmente silenciado.

En una realización, el ratón modificado genéticamente comprende un linfocito B que comprende un gen de anticuerpo reordenado que comprende un dominio hV_λ reordenado unido operativamente a un dominio C_L de ratón. En una realización, el dominio C_L de ratón se selecciona de un dominio C_k de ratón y un dominio C_λ de ratón. En una realización específica, el dominio C_λ de ratón procede de un gen de $C_{\lambda 2}$. En una realización específica, el dominio C_λ de ratón procede de un dominio C_λ que es al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idéntico a $C_{\lambda 2}$ de ratón.

Se describe un ratón modificado genéticamente que expresa una región V_λ en un C_L que es un C_k . Se describe un ratón modificado genéticamente que expresa una región hV_λ en un C_L seleccionado de un C_k humano, un C_λ humano o un C_k de ratón. Se describe un ratón modificado genéticamente que expresa una región hV_λ en un C_k de ratón.

En una realización, aproximadamente 10-50 % de los esplenocitos del ratón son linfocitos B (es decir, CD19 positivos) de los que aproximadamente 9-28 % expresan una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hV_λ fusionado con un dominio C_k de ratón.

En una realización específica, aproximadamente 23-34 % de los esplenocitos del ratón son linfocitos B (es decir, CD19 positivos), de los que aproximadamente 9-11 % expresan una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hV_λ fusionado con un dominio C_k de ratón.

En una realización específica, aproximadamente 19-31 % de los esplenocitos del ratón son linfocitos B (es decir, CD19 positivos), de los que aproximadamente 9-17 % expresan una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hV_λ fusionado con un dominio C_k de ratón.

En una realización específica, aproximadamente 21-38 % de los esplenocitos del ratón son linfocitos B (es decir, CD19 positivos), de los que aproximadamente 24-27 % expresan una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hV_λ fusionado con un dominio C_k de ratón.

En una realización específica, aproximadamente 10-14 % de los esplenocitos del ratón son linfocitos B (es decir, CD19 positivos), de los que aproximadamente 9-13 % expresan una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hV λ fusionado con un dominio C κ de ratón

5 En una realización específica, aproximadamente 31-48 % de los esplenocitos del ratón son linfocitos B (es decir, CD19 positivos), de los que aproximadamente 15-21 % expresan una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hV λ fusionado con un dominio C κ de ratón. En una realización específica, aproximadamente 30-38 % de los esplenocitos del ratón son linfocitos B (es decir, CD19 positivos), de los que aproximadamente 33-48 % expresan una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hV λ fusionado con un dominio C κ de ratón.

10 En una realización, aproximadamente 52-70 % de la médula ósea del ratón son linfocitos B (es decir, CD19 positivos), de los que aproximadamente 31-47 % de los linfocitos B inmaduros (es decir, CD19 positivos/B220 intermedios positivos/IgM-positivos) expresan una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hV λ fusionado con un dominio C κ de ratón.

15 En una realización, aproximadamente 60 % de la médula ósea del ratón son linfocitos B (es decir, CD19 positivos), de los que aproximadamente 38,3 % de los linfocitos B inmaduros (es decir, CD19 positivos/B220 intermedios positivos/IgM positivos) expresan una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hV λ fusionado con un dominio C κ de ratón.

20 En una realización, el ratón expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende un dominio variable procedente de un segmento génico V humano y uno J humano, y un dominio constante procedente de un gen de región constante de ratón. En una realización, el gen de región constante de ratón es un gen de C κ . En otra realización, el gen de región constante de ratón es un gen de C λ . En una realización específica, la región de C λ es C λ 2. En una realización específica, el gen de C λ de ratón procede de un gen de C λ que es al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idéntico a C λ 2 de ratón. En una realización específica, el anticuerpo comprende además una cadena pesada que comprende un dominio variable procedente de un segmento génico V humano, uno D humano y uno J humano, y un dominio constante de cadena pesada procedente de un gen de región constante de cadena pesada de ratón. En una realización, el gen de región constante de cadena pesada de ratón comprende una secuencia de bisagra-CH2-CH3 de un dominio constante de cadena pesada. En otra realización, el gen de región constante de cadena pesada de ratón comprende una secuencia de CH1-bisagra-CH2-CH3 de un dominio constante de cadena pesada. En otra realización, el gen de región constante de cadena pesada de ratón comprende una secuencia de CH1-CH2-CH3-CH4 de un dominio constante de cadena pesada. En otra realización, el gen de región constante de cadena pesada de ratón comprende una secuencia de CH2-CH3-CH4 de un dominio constante de cadena pesada.

35 En una realización, el ratón expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia V λ -J λ humana reordenada y una secuencia de C κ de ratón. En una realización, la secuencia de V λ -J λ humana reordenada procede de un reordenamiento de segmentos génicos hV λ seleccionados de un segmento génico 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-14, 3-19, 2-23, 3-25, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 9-49 y 1-51. En una realización, la secuencia de V λ -J λ humana reordenada procede de un reordenamiento de segmentos génicos hJ λ seleccionados de un segmento génico J λ 1, J λ 2, J λ 3 y J λ 7.

45 En una realización, el ratón expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera λ de inmunoglobulina reordenada que comprende una secuencia de V λ /J λ humana seleccionada de 3-1/1, 3-1/7, 4-3/1, 4-3/7, 2-8/1, 3-9/1, 3-10/1, 3-10/3, 3-10/7, 2-14/1, 3-19/1, 2-23/1, 3-25/1, 1-40/1, 1-40/2, 1-40/3, 1-40/7, 7-43/1, 7-43/3, 1-44/1, 1-44/7, 5-45/1, 5-45/2, 5-45/7, 7-46/1, 7-46/2, 7-46/7, 9-49/1, 9-49/2, 9-49/7 y 1-51/1. En una realización específica, el linfocito B expresa un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana fusionado con un dominio constante de cadena pesada de ratón, y un dominio variable de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana fusionado con un dominio constante de cadena ligera κ de ratón.

50 Se describe un ratón que expresa un anticuerpo que comprende (a) una cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada procedente de un segmento génico de región variable de cadena pesada humano no reordenado, en donde el dominio variable de cadena pesada se fusiona con una región constante de cadena pesada de ratón (C $_H$); y, (b) una cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera procedente de un hV λ no reordenado y un hJ λ , en donde el dominio variable de cadena ligera se fusiona con una región C $_L$ de ratón.

55 En una realización, el ratón comprende (i) un locus de cadena pesada que comprende un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V, D y J de ratón endógenos funcionales con todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V, D y J humanos funcionales, un gen de C $_H$ de ratón, (ii) un primer locus de cadena ligera κ que comprende un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V κ y J κ de ratón endógenos funcionales con todos, sustancialmente todos o una pluralidad de segmentos génicos hV λ y hJ λ funcionales y un gen de C κ de ratón, (iii) un segundo locus de cadena ligera λ que comprende un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V λ y J λ de ratón endógenos funcionales con todos, sustancialmente todos, o una pluralidad de segmentos génicos hV κ y hJ κ funcionales, y un gen de C κ de ratón. En una realización, el

ratón no expresa un anticuerpo que comprende una región C λ . En una realización, el ratón comprende una supresión de un gen de C λ y/o un segmento génico V λ y/o uno J λ . En una realización, el ratón comprende un locus de cadena ligera λ no funcional. En una realización específica, el locus de cadena ligera λ se suprime completamente o en parte.

- 5 En una realización, el ratón comprende (i) un locus de cadena pesada que comprende un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V, D y J de ratón endógenos funcionales con todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V, D y J humanos funcionales, un gen de C H de ratón, (ii) un primer locus de cadena ligera λ que comprende un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V λ y J λ de ratón endógenos funcionales con todos, sustancialmente todos o una pluralidad de segmentos génicos hV λ y hJ λ funcionales, y un gen de C λ de ratón, (iii) un segundo locus de cadena ligera λ que comprende un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V λ y J λ de ratón endógenos funcionales con todos, sustancialmente todos o una pluralidad de segmentos génicos hV λ y hJ λ funcionales y un gen de C λ de ratón. En una realización específica, el gen de C λ de ratón es C λ 2. En una realización específica, el gen de C λ de ratón procede de un gen de C λ que es al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idéntico a C λ 2 de ratón.

En una realización, el ratón comprende una supresión de un gen de C κ y/o un segmento génico V κ y/o un J κ . En una realización, el ratón comprende un locus de cadena ligera κ no funcional.

- 20 Se describe un ratón modificado genéticamente que expresa un anticuerpo, en donde más del 10 %, más del 15 %, más del 20 %, más del 25 %, más del 30 %, más del 35 %, más del 40 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 % o más del 90 % de anticuerpo IgG total producido por el ratón comprende un dominio variable procedente de λ , y en donde el ratón expresa anticuerpos que comprenden un dominio variable procedente de κ fusionado con una región C κ de ratón. Aproximadamente 15-40 %, 20-40 %, 25-40 %, 30-40 % o 35-40 % del anticuerpo total producido por el ratón puede comprender un dominio variable procedente de λ .

El dominio variable procedente de λ procede de un hV λ y un hJ λ . El dominio variable procedente de λ está en una cadena ligera que comprende una región C κ de ratón. En una realización, el dominio variable procedente de κ procede de un hV κ y un hJ κ , y en una realización específica está en una cadena ligera que comprende una región C κ de ratón.

- 30 Se describe una construcción de ADN aislado que comprende una rama de homología cadena arriba y una rama de homología cadena abajo, en donde las ramas de homología cadena arriba y cadena abajo dirigen la construcción a un locus κ de ratón, y la construcción comprende un segmento hV λ no reordenado funcional y un segmento hJ λ no reordenado funcional y una secuencia de selección o marcadora.

- 35 Se describe una construcción de ADN aislada, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de la transcripción, una rama de dirección para dirigir una secuencia λ de ratón cadena arriba de V λ 2 de ratón, un casete de selección flanqueado 5' y 3' con sitios de reconocimiento de recombinasa y una rama de dirección para dirigir una secuencia λ de ratón 3' de J λ 2 de ratón. En una realización, el casete de selección es un casete Hyg-TK con Frt. La rama de dirección 3' puede comprender C λ 2. J λ 4, C λ 4 de ratón y potenciador de ratón 2.4.

- 40 Se describe una construcción de ADN aislada, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de la transcripción, una rama de dirección para dirigirse al locus λ de ratón 5' con respecto a V λ 1, un casete de selección flanqueado en 5' y 3' con sitios de reconocimiento de recombinasa y una rama de dirección 3' para dirigirse a una secuencia λ de ratón 3' con respecto a C λ 1 de ratón. El casete de selección puede ser un casete de neomicina con lox. La rama de dirección 3' puede comprender el potenciador 3' λ de ratón y potenciador 3' λ de ratón 3.1.

- 45 Se describe una construcción de ADN aislada, que comprende de 5' a 3' con respecto a la dirección de la transcripción, una rama de dirección para dirigirse al locus λ de ratón 5' con respecto a V λ 2, un casete de selección flanqueado en 5' y 3' con sitios de reconocimiento de recombinasa y una rama de dirección 3' para dirigirse a una secuencia λ de ratón 3' con respecto a J λ 2 de ratón y 5' con respecto a C λ 2 de ratón. El casete de selección puede ser un casete de higromicina-TK con Frt. La rama de dirección 3' puede comprender los segmentos génicos C λ 2-J λ 4-C λ 4 de ratón y potenciador λ de ratón 2.4.

- 50 Se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de la transcripción, una rama de dirección para dirigirse al locus λ de ratón 5' con respecto a V λ 2, un casete de selección flanqueado en 5' y 3' con sitios de reconocimiento de recombinasa, un fragmento genómico humano que comprende una región contigua del locus de cadena ligera λ humano de hV λ 3-12 cadena abajo hasta el final de hJ λ 1, y una rama de dirección 3' para dirigirse a una secuencia λ de ratón 3' con respecto a J λ 2 de ratón. El casete de selección es un casete de neomicina con Frt. La rama de dirección 3' comprende los segmentos génicos C λ 2-J λ 4-C λ 4 de ratón y potenciador λ de ratón 2.4.

Se describe una construcción de ADN aislada, que comprende una región contigua del locus de cadena ligera λ humano de hV λ 3-12 cadena abajo hasta el extremo de hJ λ 1.

Se describe una construcción de ADN aislada, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, una rama de dirección para dirigirse al locus λ de ratón 5' con respecto a V λ 2, un casete de selección flanqueado en 5' y 3' con sitios de reconocimiento de recombinasa y un fragmento genómico humano que comprende una región contigua del locus de cadena ligera λ humano de hV λ 3-27 cadena abajo hasta el extremo de hV λ 2-8. El casete de selección puede ser un casete de higromicina con Frt. El fragmento genómico humano puede comprender una rama de dirección 3'. La rama de dirección 3' puede comprender aproximadamente 53 kb del locus de cadena ligera λ humano de hV λ 3-12 cadena abajo hasta el extremo de hV λ 2-8.

Se describe una construcción de ADN aislado que comprende una región contigua del locus de cadena ligera λ humano de hV λ 3-27 cadena abajo hasta el extremo de hV λ 3-12.

Se describe una construcción de ADN aislada, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, una rama de dirección para dirigirse al locus λ de ratón 5' con respecto a V λ 2, un casete de selección flanqueado en 5' y 3' con sitios de reconocimiento de recombinasa, un primer fragmento genómico humano que comprende una región contigua del locus de cadena ligera λ humano de hV λ 5-52 cadena abajo hasta el extremo de hV λ 1-40, un sitio de enzima de restricción y un segundo fragmento genómico humano que comprende una región contigua del locus de cadena ligera λ humano de hV λ 3-29 cadena abajo hasta el extremo de hV λ 82K. El casete de selección puede ser un casete de neomicina con Frt. El sitio de enzima de restricción puede ser un sitio para una endonucleasa de asentamiento. La endonucleasa de asentamiento puede ser PI-SceI. El segundo fragmento genómico humano puede ser una rama de dirección 3'. La rama de dirección 3' puede comprender aproximadamente 27 kb del locus de cadena ligera λ humano desde hV λ 3-29 cadena abajo hasta el extremo de hV λ 82K.

Se describe una construcción de ADN aislado que comprende una región contigua del locus de cadena ligera λ humano de hV λ 5-52 cadena abajo hasta el extremo de hV λ 1-40

Se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, una rama de dirección para dirigirse al locus κ de ratón 5' con respecto a los segmentos génicos V κ endógenos, dos sitios de reconocimiento de recombinasa yuxtapuestos, un casete de selección 3' de los sitios de reconocimiento de recombinasa yuxtapuestos y una rama de dirección 3' para dirigirse a una secuencia κ de ratón 5' con respecto a los segmentos génicos variables de cadena ligera κ . Los sitios de reconocimiento de recombinasa yuxtapuestos también pueden estar en orientación opuesta uno con respecto al otro. Los sitios de reconocimiento de recombinasa pueden ser diferentes. Los sitios de reconocimiento de recombinasa pueden ser un sitio loxP y un sitio lox511. El casete de selección puede ser un casete de neomicina.

Se describe una construcción de ADN aislado que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, una rama de dirección para dirigirse al locus κ de ratón 5' con respecto a los segmentos génicos J κ de ratón, un casete de selección, un sitio de reconocimiento de recombinasa 3' del casete de selección y una rama de dirección 3' para dirigirse a una secuencia κ de ratón 3' con respecto a los segmentos génicos J κ de ratón y 5' del potenciador intrínico κ de ratón. El casete de selección puede ser un casete de higromicina-TK. El sitio de reconocimiento de recombinasa puede estar en la misma dirección con respecto a la transcripción como el casete de selección. El sitio de reconocimiento de recombinasa puede ser un sitio loxP.

Se describe una construcción de ADN aislado que comprende de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un primer fragmento genómico de ratón que comprende secuencia 5' de los segmentos génicos V κ de ratón endógenos, un primer sitio de reconocimiento de recombinasa, un segundo sitio de reconocimiento de recombinasa y un segundo fragmento genómico de ratón que comprende secuencia 3' de los segmentos génicos J κ de ratón endógenos y 5' del potenciador intrínico κ de ratón.

Se describe un ratón modificado genéticamente, en donde la modificación genética comprende una modificación con una o más de las construcciones de ADN descritas anteriormente o en el presente documento.

Se describe uso de una construcción de ADN aislado para preparar un ratón como se describe en el presente documento. Se describe uso de una construcción de ADN aislado como se describe en el presente documento en un método para realizar una proteína de unión a antígeno.

Se describe una célula madre no humana que comprende un vector de dirección que comprende una construcción de ADN como se ha descrito anteriormente y en el presente documento. En un aspecto, se proporciona una célula madre no humana, en donde la célula madre no humana procede de un ratón descrito en el presente documento.

En una realización, la célula madre no humana es una célula madre embrionaria (ES). En una realización específica, la célula ES es una célula ES de ratón.

Se describe uso de una célula madre no humana como se describe en el presente documento para preparar un ratón

como se describe en el presente documento. Se describe uso de una célula madre no humana como se describe en el presente documento para realizar una proteína de unión a antígeno.

En un aspecto, se proporciona un embrión de ratón, en donde el embrión de ratón comprende una modificación genética como se proporciona en el presente documento. En una realización, se proporciona un embrión de ratón hospedador que comprende una célula ES donante, en donde la célula ES donante comprende una modificación genética como se describe en el presente documento. En una realización, el embrión de ratón es un embrión de estadio premórula. En una realización específica, el embrión de estadio premórula es un embrión de estadio de 4 células o un embrión de estadio de 8 células. En otra realización específica, el embrión de ratón es un blastocisto.

Se describe uso de un embrión de ratón como se describe en el presente documento para preparar un ratón como se describe en el presente documento. Se describe uso de un embrión de ratón como se describe en el presente documento para realizar una proteína de unión a antígeno.

Se describe una célula no humana, en donde la célula no humana comprende una secuencia de gen de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada procedente de un ratón modificado genéticamente como se describe en el presente documento. La célula puede ser un linfocito B. La célula puede ser un hibridoma. La célula puede codificar un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina y/o un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que está mutado de forma somática.

Se describe una célula no humana, en donde la célula no humana comprende una secuencia de gen de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada procedente de un ratón modificado genéticamente como se describe en el presente documento. La célula puede ser un linfocito B. La célula puede ser un hibridoma. La célula puede codificar un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina y/o un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que está mutado de forma somática.

Se describe uso de una célula no humana como se describe en el presente documento para preparar un animal no humano como se describe en el presente documento. Se describe uso de una célula no humana como se describe en el presente documento para realizar una proteína de unión a antígeno. El animal no humano es un ratón.

Se describe un linfocito B de ratón que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende (a) una región variable procedente de un segmento génico hV λ y un segmento génico hJ λ ; y (b) un gen de C κ de ratón. El linfocito B de ratón puede expresar además una cadena pesada afin que comprende (c) una región variable procedente de un segmento hV μ , un hD μ y (d) un hJ μ . En una realización, el linfocito B no comprende un gen λ reordenado. El linfocito B puede no comprender un gen κ reordenado.

Se describe un método para realizar un anticuerpo en un animal no humano modificado genéticamente, que comprende: (a) exponer un animal no humano modificado genéticamente a un antígeno, en donde el animal tiene un genoma que comprende al menos un hV λ y al menos un hJ λ en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno, en donde el locus de cadena ligera κ endógeno comprende un gen de C κ de ratón; (b) permitir que el animal modificado genéticamente desarrolle una respuesta inmunitaria al antígeno; y (c) aislar del animal de (b) un anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno, o aislar del animal de (b) una célula que comprende un dominio de inmunoglobulina que reconoce específicamente el antígeno, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera procedente de un hV λ , un hJ λ y un gen de C κ de ratón. El animal no humano es un ratón.

Se describe un método para realizar un anticuerpo en un animal no humano modificado genéticamente, que comprende: (a) exponer un animal modificado genéticamente a un antígeno, en donde el animal tiene un genoma que comprende al menos un hV λ en un locus κ endógeno y al menos un hJ λ en el locus κ , en donde el locus κ comprende un gen de C κ de ratón; (b) permitir que el animal modificado genéticamente desarrolle una respuesta inmunitaria al antígeno; y (c) aislar del animal de (b) un anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno, o aislar del ratón de (b) una célula que comprende un dominio de inmunoglobulina que reconoce específicamente el antígeno, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera procedente de un hV λ , un hJ λ y un gen de C κ de ratón.

[Eliminado]

Se describe un método para realizar un anticuerpo en un animal no humano modificado genéticamente, que comprende: (a) exponer un animal no humano modificado genéticamente a un antígeno, en donde el animal tiene un genoma que comprende al menos un hV λ en un locus de cadena ligera λ y al menos un J λ en el locus de cadena ligera λ , en donde el locus de cadena ligera λ comprende un gen de C λ no humano; (b) permitir que el animal modificado genéticamente desarrolle una respuesta inmunitaria al antígeno; y (c) aislar del animal de (b) un anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno, o aislar del animal de (b) una célula que comprende un dominio de inmunoglobulina que reconoce específicamente el antígeno, o identificar en el animal de B una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o ligera que se une con el antígeno, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera procedente de un hV λ , un hJ λ y un gen de C λ no humano. El animal no humano es un ratón.

El gen constante de cadena ligera λ puede seleccionarse de un gen de C λ humano y un gen de C λ no humano. El gen constante de cadena ligera λ puede ser un gen de C λ humano. El gen de C λ humano puede seleccionarse de C λ 1, C λ 2, C λ 3 y C λ 7. El gen constante de cadena ligera λ puede ser un gen de C λ de ratón o rata. El gen de C λ de ratón puede seleccionarse de C λ 1, C λ 2 y C λ 3. El gen de C λ de ratón puede ser C λ 2. El gen de C λ de ratón puede proceder de un gen de C λ que es al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idéntico a C λ 2 de ratón.

Se describe un método para realizar un gen de anticuerpo reordenado en un ratón modificado genéticamente, que comprende: (a) exponer un ratón modificado genéticamente a un antígeno, en donde la modificación genética comprende un hV λ y un hJ λ en un locus de cadena ligera κ endógeno, en donde el locus de cadena ligera κ endógeno comprende un gen de C κ de ratón o fragmento funcional del mismo; y (b) identificar un gen de inmunoglobulina reordenado en dicho ratón, en donde el gen de inmunoglobulina reordenado comprende un segmento génico de región variable de cadena ligera λ y un gen de C κ de ratón o fragmento funcional del mismo.

El método puede comprender además clonar una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada y/o ligera del ratón, en donde la región variable de cadena pesada y/o ligera es de un anticuerpo que comprende un V λ humano y un C κ de ratón.

[Eliminado].

Se describe un método para realizar un gen de anticuerpo reordenado en un ratón modificado genéticamente, que comprende: (a) exponer un ratón modificado genéticamente a un antígeno, en donde la modificación genética comprende un hV λ y un hJ λ en un locus de cadena ligera κ , en donde el locus de cadena ligera κ comprende un gen de C κ de ratón o fragmento funcional del mismo; y (b) identificar un gen de inmunoglobulina reordenado en dicho ratón, en donde el gen de inmunoglobulina reordenado comprende un segmento génico de región variable de cadena ligera λ y un gen de C κ de ratón o fragmento funcional del mismo.

[Eliminado].

El método puede comprender además clonar una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada y/o ligera del ratón, en donde la región variable de cadena pesada y/o ligera es de un anticuerpo que comprende un V λ humano y un C κ de ratón.

Se describe un método para realizar un gen de anticuerpo reordenado en un ratón modificado genéticamente que comprende: (a) exponer un ratón modificado genéticamente a un antígeno, en donde la modificación genética comprende un hV λ y un hJ λ en un locus de cadena ligera λ no humano, en donde el locus de cadena ligera λ comprende un gen de C λ no humano o fragmento funcional del mismo; y (b) identificar un gen de inmunoglobulina reordenado en dicho ratón, en donde el gen de inmunoglobulina reordenado comprende un segmento génico de región variable de cadena ligera λ y un gen de C λ o fragmento funcional del mismo.

El gen constante de cadena ligera λ o fragmento funcional del mismo puede seleccionarse de un gen de C λ humano y un gen de C λ de ratón o rata, o un fragmento funcional del mismo. El gen constante de cadena ligera λ puede ser un gen de C λ de ratón o rata, o un fragmento funcional del mismo.

El método puede comprender además clonar una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada y/o ligera del ratón, en donde la región variable de cadena pesada y/o ligera es de un anticuerpo que comprende un V λ humano y un C λ no humano (por ejemplo, de ratón o rata).

En un aspecto, se proporciona un método para realizar un anticuerpo, que comprende exponer a un ratón como se describe en el presente documento a un antígeno, permitir que el ratón monte una respuesta inmunitaria que comprende realizar un anticuerpo que se une específicamente con el antígeno, identificar una secuencia de ácido nucleico reordenada en el ratón que codifica cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico reordenada en el ratón que codifica una secuencia de dominio variable de cadena ligera afín de un anticuerpo, en donde el anticuerpo se une específicamente con el antígeno, y emplear las secuencias de ácido nucleico de los dominios variables de cadena pesada y ligera fusionados con dominios constantes humanos para realizar un anticuerpo deseado, en donde el anticuerpo deseado comprende una cadena ligera que comprende un dominio V λ fusionado con un dominio C κ de ratón.

En una realización, se proporciona un método para realizar un anticuerpo, que comprende exponer a un ratón como se describe en el presente documento a un antígeno, permitir que el ratón monte una respuesta inmunitaria que comprende realizar un anticuerpo que se une específicamente con el antígeno, identificar una secuencia de ácido nucleico reordenada en el ratón que codifica una cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico reordenada en el ratón que codifica una secuencia de dominio variable de cadena ligera afín de un anticuerpo, en donde el anticuerpo se une específicamente con el antígeno, y emplear las secuencias de ácido nucleico de los dominios variables de cadena pesada y ligera fusionados con secuencias de ácido nucleico de dominios constantes humanos para realizar un anticuerpo deseado, en donde el anticuerpo deseado comprende una cadena ligera que comprende un dominio V λ

fusionado con un dominio C_k.

En una realización, se proporciona un método para realizar un anticuerpo, que comprende exponer un ratón como se describe en el presente documento a un antígeno, permitir que el ratón monte una respuesta inmunitaria que comprende realizar un anticuerpo que se une específicamente con el antígeno, identificar una secuencia de ácido nucleico reordenada en el ratón que codifica un dominio variable de cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico reordenada que codifica una secuencia de dominio variable de cadena ligera afín de un anticuerpo, en donde el anticuerpo se une específicamente con el antígeno, y emplear las secuencias de ácido nucleico fusionadas con secuencias de ácido nucleico que codifican un dominio constante de cadena pesada humana y un dominio constante de cadena ligera humana para realizar un anticuerpo procedente de secuencias humanas, en donde el anticuerpo que se une específicamente con el antígeno comprende una cadena ligera que comprende un dominio V_L humano fusionado con una región C_L no humana (por ejemplo, de ratón o rata).

En una realización, la región C_L es de ratón, y en una realización se selecciona de C_L1, C_L2 y C_L3. En una realización específica, la región C_L de ratón es C_L2.

En un aspecto, se proporciona un método para realizar una secuencia de gen de región variable de cadena ligera de anticuerpo reordenada, que comprende (a) exponer un ratón como se describe en el presente documento a un antígeno; (b) permitir que el ratón monte una respuesta inmunitaria; (c) identificar una célula en el ratón que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de dominio V_L humano reordenada fusionada con un dominio C_k de ratón, en donde la célula también codifica una cadena pesada afín que comprende un dominio V_H humano y un dominio C_H no humano, y en donde la célula expresa un anticuerpo que se une con el antígeno; (d) clonar a partir de la célula una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio V_L humano y una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio V_H humano afín; y (e) usar la secuencia de ácido nucleico clonada que codifica el dominio V_L humano y la secuencia de ácido nucleico clonada que codifica el dominio V_H humano afín para realizar un anticuerpo completamente humano.

En una realización, se proporciona un método para realizar una secuencia de gen de región variable de cadena ligera de anticuerpo reordenada, que comprende (a) exponer un ratón como se describe en la presente divulgación a un antígeno; (b) permitir que el ratón monte una respuesta inmunitaria; (c) identificar una célula en el ratón que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de dominio V_L humano reordenada contigua en la misma molécula de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio C_k del ratón, en donde la célula también codifica una cadena pesada afín que comprende un dominio V_H humano y un dominio C_H del ratón, y en donde la célula expresa un anticuerpo que se une al antígeno; (d) clonar a partir de la célula una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio V_L humano y una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio V_H humano afín; y, (e) usar la secuencia de ácido nucleico clonada que codifica el dominio V_L humano y la secuencia de ácido nucleico clonada que codifica el dominio V_H humano afín para realizar un anticuerpo completamente humano.

En una realización, se proporciona un método para realizar una secuencia de gen de región variable de cadena ligera de anticuerpo reordenada, que comprende (a) exponer un ratón como se describe en el presente documento a un antígeno; (b) permitir que el ratón monte una respuesta inmunitaria al antígeno; (c) identificar una célula en el ratón que comprende ADN que codifica una secuencia de dominio V_L humano reordenada fusionada con un dominio C_L no humano del ratón, en donde la célula también codifica una cadena pesada afín que comprende un dominio V_H humano y un dominio C_H no humano del ratón, y en donde la célula expresa un anticuerpo que se une con el antígeno; (d) clonar a partir de la célula una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio V_L humano reordenado y una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio V_H humano afín; y (e) usar la secuencia de ácido nucleico clonada que codifica el dominio V_L humano y la secuencia de ácido nucleico clonada que codifica el dominio V_H humano afín para realizar un anticuerpo completamente humano. En una realización, el animal no humano es ratón y el dominio C_L es C_L2 de ratón. En una realización específica, el dominio C_L de ratón procede de un gen de C_L que es al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idéntico a C_L2 de ratón.

Se describe un animal no humano modificado genéticamente que expresa una cadena ligera procedente de λ humana fusionada con una región constante de cadena ligera endógena (C_L), en donde el animal, tras inmunización con antígeno, realiza un anticuerpo que comprende un dominio V_L humano fusionado con un dominio C_L no humano del animal. El dominio C_L no humano puede seleccionarse de un dominio C_k y un dominio C_L. El dominio C_L puede ser un dominio C_k. El animal es un ratón. El dominio C_L de ratón puede ser un dominio C_L. El dominio C_L puede ser C_L2. El dominio C_L de ratón puede proceder de un gen de C_L que es al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idéntico a C_L2 de ratón.

Se describe un animal no humano modificado genéticamente que comprende un locus de cadena ligera κ endógeno modificado como se describe en el presente documento que expresa una pluralidad de cadenas ligeras λ de inmunoglobulina asociadas con una pluralidad de cadenas pesadas de inmunoglobulina. La cadena pesada puede comprender una secuencia humana. La secuencia humana puede seleccionarse de una secuencia variable, una C_H1, una bisagra, una C_H2, una C_H3 y una combinación de las mismas. La pluralidad de cadenas ligeras λ de inmunoglobulina puede comprender una secuencia humana. La secuencia humana puede seleccionarse de una secuencia variable, una secuencia constante y una combinación de las mismas. El animal puede comprender un locus

de inmunoglobulina endógeno inactivado y expresa la cadena pesada y/o la cadena ligera λ de un transgén o episoma extracromosómico. El animal puede comprender un reemplazo en un locus endógeno (no humano) de algunos o todos los segmentos génicos de cadena pesada no humanos (es decir, V, D, J) y/o algunas o todas las secuencias constantes de cadena pesada no humanas endógenas (por ejemplo, C_H1, bisagra, C_H2, C_H3, o una combinación de las mismas) y/o algunas o todas las secuencias de cadena ligera no humanas endógenas (por ejemplo, V, J, constante o una combinación de las mismas), con una o más secuencias de inmunoglobulina humana. El animal no humano es un ratón.

Se describe un animal no humano adecuado para realizar anticuerpos que tienen una cadena ligera procedente de λ humana, en donde todos o sustancialmente todos los anticuerpos realizados en el animal no humano se expresan con una cadena ligera procedente de λ humana. La cadena ligera procedente de λ humana puede expresarse a partir de un locus de cadena ligera endógeno. El locus de cadena ligera endógeno puede ser un locus de cadena ligera κ . El animal es un ratón y el locus de cadena ligera κ puede ser un locus de cadena ligera κ de ratón.

En un aspecto, se proporciona un método para realizar una cadena ligera procedente de λ para un anticuerpo humano, que comprende obtener de un ratón como se describe en el presente documento una secuencia de cadena ligera y una secuencia de cadena pesada, y emplear la secuencia de cadena ligera y la secuencia de cadena pesada en la realización de un anticuerpo humano.

En un aspecto, se proporciona un método para realizar una proteína de unión a antígeno, que comprende exponer un ratón como se describe en el presente documento a un antígeno; permitir que el ratón monte una respuesta inmunitaria; y obtener del ratón una proteína de unión a antígeno que se une con el antígeno, u obtener del ratón una secuencia para emplear en la realización de una proteína de unión a antígeno que se une con el antígeno.

En un aspecto, se proporciona una célula procedente de un ratón como se describe en el presente documento. En una realización, la célula se selecciona de una célula madre embrionaria, una célula pluripotente, una célula pluripotente inducida, un linfocito B y un hibridoma.

En un aspecto, se proporciona una célula que comprende una modificación genética como se describe en el presente documento. En una realización, la célula es una célula de ratón. En una realización, la célula se selecciona de un hibridoma y un cuadroma. En una realización, la célula expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una secuencia variable λ humana fusionada con una secuencia constante κ humana. En una realización específica, la secuencia constante de ratón es una secuencia constante κ de ratón.

En un aspecto, se proporciona un tejido procedente de un ratón como se describe en el presente documento.

En un aspecto, se proporciona uso de un ratón o una célula como se describe en el presente documento para realizar una proteína de unión a antígeno. En una realización, la proteína de unión a antígeno es una proteína humana. En una realización, la proteína humana es un anticuerpo humano.

Se describe una proteína de unión a antígeno realizada por un animal, célula, tejido de ratón o método como se describe en el presente documento. La proteína de unión a antígeno puede ser una proteína humana. La proteína humana puede ser un anticuerpo humano.

Cualquiera de las realizaciones y aspectos descritos en el presente documento pueden usarse juntos entre sí, a no ser que se indique o resulte evidente otra cosa a partir del contexto. Otras realizaciones resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de una revisión de la descripción siguiente.

Breve descripción de las figuras

La **FIGURA 1A** muestra una ilustración general, no a escala, de reemplazo genómico directo de aproximadamente tres megabases (Mb) de un locus de gen variable de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón (símbolos cerrados) con aproximadamente una megabase (Mb) del locus de gen variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana (símbolos abiertos).

La **FIGURA 1B** muestra una ilustración general, no a escala, del reemplazo genómico directo de aproximadamente tres megabases (Mb) de un locus de gen variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón (símbolos cerrados) con aproximadamente 0,5 megabases (Mb) de la primera, o próxima, de dos repeticiones casi idénticas del locus de gen variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina humana (símbolos abiertos).

La **FIGURA 2A** muestra una ilustración detallada, no a escala, de tres etapas iniciales (A-C) para reemplazo genómico directo de un locus de gen variable de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón que da como resultado supresión de todos los segmentos génicos V_H, D_H y J_H de ratón y reemplazo con tres segmentos génicos V_H humanos, todos los D_H y J_H humanos. Se muestra un vector de dirección para una primera inserción de segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina humana (BACvec 3hV_H) con una rama de homología de ratón 5' de 67 kb, un casete de selección (rectángulo abierto), un sitio de recombinación específica (triángulo abierto), un fragmento genómico humano de 145 kb y una rama de homología de ratón 3' de 8 kb. Se muestran segmentos génicos de inmunoglobulina humana (símbolos abiertos) y de ratón (símbolos cerrados), casetes de

selección adicionales (rectángulos abiertos) y sitios de recombinación específica (triángulos abiertos) insertados a partir de vectores de dirección subsiguientes.

La **FIGURA 2B** muestra una ilustración detallada, no a escala, de seis etapas adicionales (D-I) para reemplazo genómico directo de un locus de gen variable de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón que da como resultado la inserción de 77 segmentos génicos V_H humanos adicionales y retirada de un casete de selección final. Se muestra un vector de dirección para inserción de segmentos génicos V_H humanos adicionales (BACvec 18h V_H) a la inserción inicial de segmentos génicos de cadena pesada humana (Alelo Híbrido 3h V_H -CRE) con una rama de homología de ratón 5' de 20 kb, un casete de selección (rectángulo abierto), un fragmento genómico humano de 196 kb y una rama de homología humana de 62 kb que solapa con el extremo 5' de la inserción inicial de segmentos génicos de cadena pesada humanos que se muestra con un sitio de recombinación específica (triángulo abierto) localizado 5' de los segmentos génicos humanos. Se muestran segmentos génicos de inmunoglobulina humanos (símbolos abiertos) y de ratón (símbolos cerrados) y casetes de selección adicionales (rectángulos abiertos) insertados por vectores de dirección posteriores.

La **FIGURA 2C** muestra una ilustración detallada, no a escala, de tres etapas iniciales (A-C) para reemplazo genómico directo de un locus de gen variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón que da como resultado supresión de todos los segmentos génicos V_k y J_k de ratón (Alelo Híbrido Ig κ -CRE). Se muestran casetes de selección (rectángulos abiertos) y sitios de recombinación específica (triángulos abiertos) insertados a partir de los vectores de dirección.

La **FIGURA 2D** muestra una ilustración detallada, no a escala, de cinco etapas adicionales (D-H) para reemplazo genómico directo de un locus de gen variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón que da como resultado la inserción de todos los segmentos génicos V_k y J_k humanos en la repetición próxima y supresión del casete de selección final (Alelo Híbrido 40hVkdHyg). Se muestran segmentos génicos de inmunoglobulina humanos (símbolos abiertos) y de ratón (símbolos cerrados) y casetes de selección adicionales (rectángulos abiertos) insertados por vectores de dirección subsiguientes.

La **FIGURA 3A** muestra una ilustración general, no a escala, de una estrategia de exploración que incluye las localizaciones de cebador/sonda de PCR cuantitativa (qPCR) para detectar la inserción de secuencias de genes de cadena pesada humanos y pérdida de secuencias de genes de cadena pesada de ratón en células madre embrionarias (ES) diana. La estrategia de exploración en células ES y ratones para una primera inserción de gen de cadena pesada humano se muestra con conjuntos de cebadores/sondas de qPCR para la región suprimida (sondas de "pérdida" C y D), la región insertada (sondas de "hlgH" G y H) y regiones flanqueantes (sondas de "retención" A, B, E y F) en un cromosoma de ratón sin modificar (parte superior) y un cromosoma dirigido de forma correcta (parte inferior).

La **FIGURA 3B** muestra un cálculo representativo del número de copias de sondas observado en células ES parentales y modificadas para una primera inserción de segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina humana. Se calculó el número de copias de sondas observado para las sondas A a F como $2/\Delta\Delta Ct$. $\Delta\Delta Ct$ se calcula como $\text{pro}[\Delta Ct(\text{muestra}) - \text{med}\Delta Ct(\text{control})]$ donde ΔCt es la diferencia en Ct entre las sondas de ensayo y de referencia (entre 4 y 6 sondas de referencia dependiendo del ensayo). La expresión $\text{med}\Delta Ct(\text{control})$ es la mediana de ΔCt de múltiples (>60) muestras de ADN no dirigidas de células ES parentales. Cada clon de células ES modificado se ensayó por sextuplicado. Para calcular los números de copias de sondas de IgH G y H en células ES parentales, se presupone que estas sondas tienen un número de copias de 1 en células ES modificadas y un Ct máximo de 35 incluso aunque no se observó ninguna amplificación.

La **FIGURA 3C** muestra un cálculo representativo de los números de copias para cuatro ratones de cada genotipo calculados usando solamente las sondas D y H. Ratones de tipo silvestre: ratones TS; ratones heterocigotos para una primera inserción de segmentos génicos de inmunoglobulina humana: ratones HET; ratones homocigotos para una primera inserción de segmentos génicos de inmunoglobulina humana: ratones Homo.

La **FIGURA 4A** muestra una ilustración detallada, no a escala, de las tres etapas empleadas para la construcción de un BACvec 3h V_H mediante recombinación homóloga bacteriana (BHR). Se muestran segmentos génicos de inmunoglobulina humana (símbolos abiertos) y de ratón (símbolos cerrados), casetes de selección (rectángulos abiertos) y sitios de recombinación específicos (triángulos abiertos) insertados a partir de vectores de dirección.

La **FIGURA 4B** muestra electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE) de tres clones de BAC (B1, B2 y B3) después de digestión con NotI. Los marcadores M1, M2 y M3 son marcadores de PFG de rango bajo, rango medio y escalera lambda, respectivamente (New England BioLabs, Ipswich, MA)

La **FIGURA 5A** muestra una ilustración esquemática, no a escala, de modificaciones secuenciales del locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón con cantidades crecientes de segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina humana. Se prepararon ratones homocigotos de cada uno de los tres estadios diferentes de humanización de cadena pesada. Los símbolos abiertos indican secuencia humana; los símbolos cerrados indican secuencia del ratón.

La **FIGURA 5B** muestra una ilustración esquemática, no a escala, de modificaciones secuenciales del locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón con cantidades crecientes de segmentos génicos de cadena ligera κ de inmunoglobulina humana. Se prepararon ratones homocigotos a partir de cada uno de los tres estadios diferentes de humanización de cadena ligera κ . Los símbolos abiertos indican secuencia humana; los símbolos cerrados indican secuencia del ratón.

La **FIGURA 6** muestra diagramas de puntos de FACS de poblaciones de linfocitos B en ratones de tipo silvestre y humanizados VELOCIMMUNE®. Se tiñeron células del bazo (fila superior, tercera fila desde arriba y fila inferior) o ganglio linfático inguinal (segunda fila desde arriba) de ratones de tipo silvestre (ts), VELOCIMMUNE® 1 (V1), VELOCIMMUNE® 2 (V2) o VELOCIMMUNE® 3 (V3) para linfocitos B que expresan IgM en superficie (fila superior

y segunda fila desde arriba), inmunoglobulina de superficie que contiene cadenas ligeras κ o λ (tercera fila desde arriba) o IgM de superficie de haplotipos específicos (fila inferior) y poblaciones separadas por FACS.

La **FIGURA 7A** muestra secuencias de CDR3 de cadena pesada representativas de anticuerpos VELOCIMMUNE® seleccionados aleatoriamente alrededor del punto de unión de V_H - D_H - J_H (CDR3), lo que demuestra diversidad en los puntos de unión y adiciones de nucleótidos. Las secuencias de CDR3 de cadena pesada se agrupan según el uso del segmento génico D_H , cuya línea germinal se proporciona encima de cada grupo en negrita. Se indican los segmentos génicos V_H para cada secuencia de CDR3 de cadena pesada entre paréntesis en el extremo 5' de cada secuencia (por ejemplo, 3-72 es V_{H3} -72 humano). Se indican los segmentos génicos J_H para cada CDR3 de cadena pesada entre paréntesis en el extremo 3' de cada secuencia (por ejemplo, 3 es J_{H3} humano). Las SEQ ID NO para cada secuencia mostrada son las siguientes de arriba a abajo: SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39.

La **FIGURA 7B** muestra secuencias de CDR3 de cadena ligera representativas de anticuerpos VELOCIMMUNE® seleccionados aleatoriamente alrededor del punto de unión de V_k - J_k (CDR3), que demuestran diversidad en el punto de unión y adiciones de nucleótidos. Se indican los segmentos génicos V_k para cada secuencia de CDR3 de cadena ligera entre paréntesis en el extremo 5' de cada secuencia (por ejemplo, 1-6 es V_{k1} -6 humano). Se indican los segmentos génicos J_k para cada CDR3 de cadena ligera entre paréntesis en el extremo 3' de cada secuencia (por ejemplo, 1 es J_{k1} humano). Las SEQ ID NO para cada secuencia mostrada son las siguientes de arriba a abajo: SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46; SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 49; SEQ ID NO: 50; SEQ ID NO: 51; SEQ ID NO: 52; SEQ ID NO: 53; SEQ ID NO: 54; SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 57; ID SEQ NO: 58.

La **FIGURA 8** muestra frecuencias de hipermutación somática de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos VELOCIMMUNE® puntuadas (después del alineamiento con secuencias de línea germinal coincidentes) como el porcentaje de secuencias cambiado en cada posición de nucleótido (NT; columna izquierda) o aminoácido (AA; columna derecha) entre conjuntos de 38 (IgM sin inmunizar), 28 (IgG sin inmunizar), 32 (Igk sin inmunizar de IgG), 36 (IgG inmunizado) o 36 (Igk inmunizado de IgG) secuencias. Las barras sombreadas indican las localizaciones de las CDR.

La **FIGURA 9A** muestra niveles de inmunoglobulina en suero para isotipos IgM e IgG en ratones de tipo silvestre (barras abiertas) o VELOCIMMUNE® (barras cerradas).

La **FIGURA 9B** muestra niveles de inmunoglobulina en suero para isotipo IgA en ratones de tipo silvestre (barras abiertas) o VELOCIMMUNE® (barras cerradas).

La **FIGURA 9C** muestra niveles de inmunoglobulina en suero para isotipo IgE en ratones de tipo silvestre (barras abiertas) o VELOCIMMUNE® (barras cerradas).

La **FIGURA 10A** muestra títulos de IgG específicos de antígeno contra receptor de interleucina-6 (IL-6R) de suero de siete ratones VELOCIMMUNE® (VI) y cinco de tipo silvestre (TS) después de dos (muestra de sangre 1) o tres (muestra de sangre 2) ciclos de inmunización con ectodominio de IL-6R.

La **FIGURA 10B** muestra títulos específicos de isotipo IgG específicos de IL-6R de siete ratones VELOCIMMUNE® (VI) y cinco de tipo silvestre (TS).

La **FIGURA 11A** muestra la distribución de afinidad de anticuerpos monoclonales antirreceptor de interleucina 6 generados en ratones VELOCIMMUNE®.

La **FIGURA 11B** muestra el bloqueo específico de antígeno de anticuerpos monoclonales antirreceptor de interleucina 6 generados en ratones VELOCIMMUNE® (VI) y tipo silvestre (TS).

La **FIGURA 12** muestra una ilustración esquemática, no a escala, de genes de ADAM6a y ADAM6b de ratón en un locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón. Se muestra un vector de dirección (vector de dirección mADAM6) usado para inserción de ADAM6a y ADAM6b de ratón en un locus de cadena pesada endógeno humanizado con un casete de selección (HYG: higromicina) flanqueado por sitios de recombinación específica (Frt) que incluyen sitios de restricción generados por ingeniería genética en los extremos 5' y 3'.

La **FIGURA 13** muestra una ilustración esquemática, no a escala, de un pseudogén de ADAM6 humano (hADAM6 Ψ) localizado entre los segmentos génicos variables de cadena pesada humanos 1-2 (V_{H1-2}) y 6-1 (V_{H6-1}). Se muestra un vector de dirección para recombinación homóloga bacteriana (Vector de Dirección hADAM6 Ψ) para suprimir un pseudogén de ADAM6 humano e insertar sitios de restricción únicos en un locus de cadena pesada humano con un casete de selección (NEO: neomicina) flanqueado por sitios de recombinación específica (loxP) que incluyen sitios de restricción modificados con ingeniería genética en los extremos 5' y 3'. Se muestra una ilustración, no a escala, del locus de cadena pesada humanizado diana resultante que contiene un fragmento genómico que codifica los genes de ADAM6a y ADAM6b de ratón que incluyen un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación específica.

La **FIGURA 14A** muestra diagramas de contornos de FACS de linfocitos seleccionados según singuletes para expresión en superficie de IgM y B220 en la médula ósea para ratones homocigotos para loci d de cadena pesada humana y ligera κ humana ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico de ratón insertado que comprende genes de ADAM6 de ratón ($H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$). Se indica en cada diagrama de contornos el porcentaje de linfocitos B inmaduros (B220^{int}IgM⁺) y maduros (B220^{alto}IgM⁺).

La **FIGURA 14B** muestra el número total de linfocitos B inmaduros (B220^{int}IgM⁺) y maduros (B220^{alto}IgM⁺) en la médula ósea aislada de fémures de ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera

κ humana que tienen un fragmento genómico de ratón ectópico que codifica genes de ADAM6 de ratón ($H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$).

La **FIGURA 15A** muestra diagramas de contornos de FACS de linfocitos B seleccionados por $CD19^+$ para expresión en superficie de c-kit y $CD43$ en la médula ósea para ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico de ratón ectópico que codifica genes de ADAM6 de ratón ($H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$). Se indica el porcentaje de prolinfocitos B ($CD19^+CD43^+ckit^+$) y prelinfocitos B ($CD19^+CD43^-ckit^+$) en los cuadrantes superior derecho e inferior izquierdo, respectivamente, de cada diagrama de contornos.

La **FIGURA 15B** muestra el número total de prolinfocitos B ($CD19^+CD43^+ckit^+$) y prelinfocitos B ($CD19^+CD43^-ckit^+$) en la médula ósea aislada de fémures de ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico de ratón ectópico que comprende genes de ADAM6 de ratón ($H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$).

La **FIGURA 16A** muestra diagramas de contornos de FACS de linfocitos seleccionados según singuletes para expresión en superficie de $CD19$ y $CD43$ en la médula ósea para ratones homocigotos para loci de cadena pesada humana y ligera κ humana ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico de ratón ectópico que codifica genes de ADAM6 de ratón ($H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$). Se indica en cada diagrama de contornos el porcentaje de linfocitos B inmaduros ($CD19^+CD43^-$), pre B ($CD19^+CD43^{int}$) y pro B ($CD19^+CD43^+$).

La **FIGURA 16B** muestra histogramas de linfocitos B inmaduros ($CD19^+CD43^-$) y pre B ($CD19^+CD43^{int}$) en la médula ósea de ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico de ratón ectópico que codifica genes de ADAM6 de ratón ($H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$).

La **FIGURA 17A** muestra diagramas de contornos de FACS de linfocitos seleccionados según singuletes para expresión en superficie de $CD19$ y $CD3$ en esplenocitos para ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico de ratón ectópico que codifica genes de ADAM6 de ratón ($H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$). Se observa en cada diagrama de contornos el porcentaje de linfocitos B ($CD19^+CD3^-$) y T ($CD19^-CD3^+$).

La **FIGURA 17B** muestra diagramas de contornos de FACS para linfocitos B seleccionados por $CD19^+$ para expresión en superficie de cadena ligera $Ig\lambda$ e $Ig\kappa$ en el bazo de ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico de ratón ectópico que codifica genes de ADAM6 de ratón ($H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$). Se indica en cada diagrama de contornos el porcentaje de linfocitos B $Ig\lambda^+$ (cuadrante superior izquierdo) e $Ig\kappa^+$ (cuadrante inferior derecho).

La **FIGURA 17C** muestra el número total de linfocitos B $CD19^+$ en el bazo de ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico de ratón ectópico que codifica genes de ADAM6 de ratón ($H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$).

La **FIGURA 18A** muestra diagramas de contornos de FACS de linfocitos B seleccionados por $CD19^+$ para expresión en superficie de IgD e IgM en el bazo de ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico de ratón que codifica genes de ADAM6 de ratón ($H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$). Se indica para cada diagrama de contornos el porcentaje de linfocitos B maduros ($CD19^+IgD^{alto}IgM^{int}$). La flecha en el diagrama de contornos derecho ilustra el proceso de maduración para linfocitos B en relación con expresión en superficie de IgM e IgD .

La **FIGURA 18B** muestra el número total de linfocitos B en el bazo de ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico de ratón ectópico que codifica genes de ADAM6 de ratón ($H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$) durante la maduración de $CD19^+IgM^{alto}IgD^{int}$ a $CD19^+IgM^{int}IgD^{alto}$.

La **FIGURA 19** muestra una ilustración detallada, no a escala, del locus de cadena ligera λ humano que incluye los grupos de segmentos génicos $V\lambda$ (A, B y C) y los pares de regiones $J\lambda$ y $C\lambda$ (pares J-C).

La **FIGURA 20** muestra una ilustración general, no a escala, de una estrategia de dirección usada para inactivar el locus de cadena ligera λ de ratón endógeno.

La **FIGURA 21** muestra una ilustración general, no a escala, de una estrategia de dirección usada para inactivar el locus de cadena ligera κ de ratón endógeno.

La **FIGURA 22A** muestra una ilustración general, no a escala de un vector de dirección inicial para dirigir el locus de cadena ligera λ de ratón endógeno con secuencias de cadena ligera λ humana que incluyen 12 segmentos génicos $hV\lambda$ y segmento génico $hJ\lambda 1$ (vector de dirección 12/1- λ).

La **FIGURA 22B** muestra una ilustración general, no a escala, de cuatro vectores de dirección iniciales para dirigirse al locus de cadena ligera κ de ratón endógeno con secuencias de cadena ligera λ humana que incluyen 12 segmentos génicos $hV\lambda$ y segmento génico $hJ\lambda 1$ (vector de dirección 12/1- κ), 12 segmentos génicos $hV\lambda$ y segmentos génicos $hJ\lambda 1$, 2, 3 y 7 (Vector de Dirección 12/4- κ), 12 segmentos génicos $hV\lambda$, una secuencia genómica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana y segmento génico $hJ\lambda 1$ (Vector de Dirección 12(κ)1- κ) y 12 segmentos génicos $hV\lambda$, una secuencia genómica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana y segmentos génicos $hJ\lambda 1$, 2, 3 y 7 (Vector de Dirección 12(κ)4- κ).

La **FIGURA 23A** muestra una ilustración general, no a escala, de una estrategia de dirección para inserción progresiva de 40 segmentos génicos hVλ y un único segmento génico hJλ en el locus de cadena ligera λ de ratón. La **FIGURA 23B** muestra una ilustración general, no a escala, de una estrategia de dirección para inserción progresiva de 40 segmentos génicos hVλ y un único segmento génico hJλ en el locus κ de ratón.

La **FIGURA 24** muestra una ilustración general, no a escala, de las etapas de dirección e ingeniería molecular empleados para realizar vectores de dirección híbridos λ-κ humanos únicos para construcción de un locus de cadena ligera híbrido que contiene una secuencia intergénica κ humana, múltiples segmentos génicos hJλ o ambos.

La **FIGURA 25A** muestra una ilustración general, no a escala, de la estructura de locus para un locus de cadena ligera λ de ratón modificado que contiene 40 segmentos génicos hVλ y un único segmento génico hJλ unido operativamente con el gen de Cλ2 endógeno.

La **FIGURA 25B** muestra una ilustración general, no a escala, de la estructura de locus para cuatro loci de cadena ligera κ de ratón modificados, independientes, que contienen 40 segmentos génicos hVλ y uno o cuatro segmentos génicos hJλ con o sin una secuencia genómica Vκ-Jκ humana contigua unida operativamente con el gen de Cκ endógeno.

La **FIGURA 26A** muestra diagramas de contornos de esplenocitos Igλ⁺ e Igκ⁺ seleccionados según CD19⁺ a partir de un ratón de tipo silvestre (TS), un ratón homocigoto para 12 segmentos génicos hVλ y cuatro hJλ que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (12hVλ-VκJκ-4hJλ) y un ratón homocigoto para 40 segmentos génicos hVλ y uno hJλ (40hVλ-1hJλ).

La **FIGURA 26B** muestra el número total de linfocitos B CD19⁺ en bazo recogidos de ratones de tipo silvestre (TS), homocigotos para 12 segmentos génicos hVλ y cuatro hJλ que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (12hVλ-VκJκ-4hJλ) y ratones homocigotos para 40 segmentos génicos hVλ y un hJλ (40hVλ-1hJλ).

La **FIGURA 27A**, en el panel superior, muestra diagramas de contornos de esplenocitos seleccionados según singuletes y teñidos para linfocitos B y T (CD19⁺ y CD3⁺, respectivamente) a partir de un ratón de tipo silvestre (TS) y un ratón homocigoto para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-VκJκ-4hJλ). El panel inferior muestra diagramas de contornos de esplenocitos seleccionados según CD19⁺ y teñidos para expresión de Igλ⁺ e Igκ⁺ a partir de un ratón de tipo silvestre (TS) y un ratón homocigoto para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-VκJκ-4hJλ).

La **FIGURA 27B** muestra el número total de linfocitos B CD19⁺, CD19⁺Igκ⁺ y CD19⁺Igλ⁺ en bazo recogidos de ratones de tipo silvestre (TS) y ratones homocigotos para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-VκJκ-4hJλ).

La **FIGURA 27C** muestra diagramas de contornos de esplenocitos seleccionados según CD19⁺ y teñidos para inmunoglobulina D (IgD) e inmunoglobulina M (IgM) a partir de un ratón de tipo silvestre (TS) y un ratón homocigoto para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-VκJκ-4hJλ). Se indican en cada uno de los diagramas de contornos linfocitos B maduros (72 para TS, 51 para 40hVλ-VκJκ-4hJλ) y transicionales (13 para TS, 22 para 40hVλ-VκJκ-4hJλ).

La **FIGURA 27D** muestra el número total de linfocitos B CD19⁺, linfocitos B transicionales (CD19⁺IgM^{alto}IgD^{bajo}) y linfocitos B maduros (CD19⁺IgM^{bajo}IgD^{alto}) en bazo recogidos de ratones de tipo silvestre (TS) y ratones homocigotos para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-VκJκ-4hJλ).

La **FIGURA 28A**, en el panel superior, muestra diagramas de contornos de médula ósea teñida para linfocitos B y T (CD19⁺ y CD3⁺, respectivamente) a partir de un ratón de tipo silvestre (TS) y un ratón homocigoto para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-VκJκ-4hJλ). El panel inferior muestra diagramas de contornos de médula ósea seleccionada según CD19⁺ y teñida para ckit⁺ y CD43⁺ de un ratón de tipo silvestre (TS) y un ratón homocigoto para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40 hVλ- VκJκ-4hJλ). Se indican en los diagramas de contornos del panel inferior Pro y Prelinfocitos B.

La **FIGURA 28B** muestra el número de Pro (CD19⁺CD43⁺ckit⁺) y Pre (CD19⁺CD43⁺ckit⁺) linfocitos B en médula ósea recogida de los fémures de ratones de tipo silvestre (TS) y ratones homocigotos para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-VκJκ-4hJλ).

La **FIGURA 28C** muestra diagramas de contornos de médula ósea seleccionados según singuletes teñidos para inmunoglobulina M (IgM) y B220 de un ratón de tipo silvestre (TS) y un ratón homocigoto para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-VκJκ-4hJλ). Se indican en cada una de los diagramas de contornos linfocitos B inmaduros, maduros y pro/pre.

La **FIGURA 28D** muestra el número total de linfocitos B inmaduros (B220^{int}IgM⁺) y maduros (B220^{alto}IgM⁺) en médula ósea aislada de los fémures de ratones de tipo silvestre (TS) y ratones homocigotos para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-VκJκ-4hJλ).

La **FIGURA 28E** muestra diagramas de contornos de médula ósea seleccionada según linfocitos B inmaduros (B220^{int}IgM⁺) y maduros (B220^{alto}IgM⁺) teñidos para expresión de Igλ e Igκ aislados de los fémures de un ratón de tipo silvestre (TS) y un ratón homocigoto para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-VκJκ-4hJλ).

La **FIGURA 29** muestra un alineamiento de secuencias de nucleótidos del punto de unión de Vλ-Jλ-Cκ de dieciocho clones de RT-PCR independientes amplificados a partir de ARN de esplenocitos de ratones que portan secuencias de genes de cadena ligera λ humanos en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno. A6 = SEQ ID NO: 115; B6 = SEQ ID NO: 116; F6 = SEQ ID NO: 117; B7 = SEQ ID NO: 118; E7 = SEQ ID NO: 119; F7 = SEQ ID NO:

120; C8 = SEQ ID NO: 121; E12 = SEQ ID NO: 122; 1-4 = SEQ ID NO: 123; 1-20 = SEQ ID NO: 124; 3B43 = SEQ ID NO: 125; 5-8 = SEQ ID NO: 126; 5-19 = ID SEQ NO: 127; 1010 = SEQ ID NO: 128; 11A1 = SEQ ID NO: 129; 7A8 = SEQ ID NO: 130; 3A3 = SEQ ID NO: 131; 2-7 = SEQ ID NO: 132. Las bases en minúsculas indican bases que no son de línea germinal resultantes de la mutación y/o adición de N durante la recombinación. Se indican en la parte inferior del alineamiento de secuencias aminoácidos consenso dentro de la región marco conservada 4 (FWR4) codificada por la secuencia de nucleótidos de hJλ1 y Cκ de ratón.

La **FIGURA 30** muestra un alineamiento de secuencias de nucleótidos del punto de unión de Vλ-Jλ-Cκ de doce clones de RT-PCR independientes amplificados a partir del ARN de esplenocitos de ratones que portan secuencias de genes de cadena ligera λ humanos que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana contigua en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno. 5-2 = SEQ ID NO: 145; 2-5 = SEQ ID NO: 146; 1-3 = SEQ ID NO: 147; 4B-1 = SEQ ID NO: 148; 3B-5 = SEQ ID NO: 149; 7A-1 = SEQ ID NO: 150; 5-1 = SEQ ID NO: 151; 4A-1 = SEQ ID NO: 152; 11A-1 = SEQ ID NO: 153; 5-7 = SEQ ID NO: 154; 5-4 = SEQ ID NO: 155; 2-3 = SEQ ID NO: 156. Las bases en minúsculas indican bases que no son de línea germinal resultantes de mutación y/o adición de N durante la recombinación. Se indican en la parte inferior del alineamiento de secuencias aminoácidos consenso dentro de la región marco conservada 4 (FWR4) codificada por la secuencia de nucleótidos de cada Jλ humano y Cκ de ratón.

La **FIGURA 31** muestra un alineamiento de secuencias de nucleótidos del punto de unión de Vλ-Jλ-Cλ de tres clones de RT-PCR independientes amplificados a partir de ARN de esplenocitos de ratones que portan secuencias de genes de cadena ligera λ humanos en un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno. 2D1 = SEQ ID NO: 159; 2D9 = SEQ ID NO: 160; 3E15 = SEQ ID NO: 161. Las bases en minúsculas indican bases que no son de línea germinal resultantes de mutación y/o adición de N durante la recombinación. Se indican en la parte inferior del alineamiento de aminoácidos consenso dentro de la región marco conservada 4 (FWR4) codificada por la secuencia de nucleótidos de hJλ1 y CA2 de ratón.

Descripción detallada

La presente divulgación no está limitada a métodos particulares y condiciones experimentales descritas, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir solamente realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones.

A no ser que se definan de otro modo, todos los términos y expresiones usados en el presente documento incluyen los significados que los términos y expresiones han obtenido en la técnica, a menos que lo contrario se indique claramente o resulte claramente evidente a partir del contexto en el que se usa el término o expresión. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen ahora métodos y materiales particulares.

La expresión "sustancial" o "sustancialmente" cuando se usa para hacer referencia a una cantidad de segmentos génicos (por ejemplo, "sustancialmente todos" los segmentos génicos V) incluye segmentos génicos tanto funcionales como no funcionales e incluyen, en diversas realizaciones, por ejemplo, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más 96 % o más, 97 % o más, 98 % o más o 99 % o más de todos los segmentos génicos; en diversas realizaciones, "sustancialmente todos" los segmentos génicos incluyen, por ejemplo, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de segmentos génicos funcionales (es decir, no pseudogenes).

El término "reemplazo" incluye en donde una secuencia de ADN se sitúa en un genoma de una célula de tal modo que reemplaza una secuencia en el genoma con una secuencia heteróloga (por ejemplo, una secuencia humana en un ratón), en el locus de la secuencia genómica. La secuencia de ADN situada de este modo puede incluir una o más secuencias reguladoras que son parte de ADN fuente usado para obtener la secuencia situada de este modo (por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones no traducidas 5' o 3', secuencias señal de recombinación apropiadas, etc.). Por ejemplo, en diversas realizaciones, el reemplazo es una sustitución de una secuencia heteróloga por una secuencia endógena que da como resultado la producción de un producto génico a partir de la secuencia de ADN situada de este modo (que comprende la secuencia heteróloga), pero no la expresión de la secuencia endógena; el reemplazo es de una secuencia genómica endógena con una secuencia de ADN que codifica una proteína que tiene una función similar a una proteína codificada por la secuencia genómica endógena (por ejemplo, la secuencia genómica endógena codifica un gen o dominio de inmunoglobulina y el fragmento de ADN codifica uno o más genes o dominios de inmunoglobulina humanos). En diversas realizaciones, un gen endógeno o fragmento del mismo se reemplaza con un gen humano correspondiente o fragmento del mismo. Un gen humano correspondiente o fragmento del mismo es un gen humano o fragmento que es un ortólogo de, un homólogo de o es sustancialmente idéntico o igual en su estructura y/o función al gen endógeno o fragmento del mismo que se reemplaza.

El término "contiguo" incluye referencia a aparición en la misma molécula de ácido nucleico, por ejemplo, dos secuencias de ácido nucleico son "contiguas" si aparecen en la misma molécula nucleica pero están interrumpidas por otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, una secuencia V(D)J reordenada es "contigua" con una secuencia génica de región constante, aunque el codón final de la secuencia de V(D)J no esté seguido inmediatamente de un primer codón de la secuencia de región constante. En otro ejemplo, dos secuencias de segmentos génicos V son "contiguas" si aparecen en el mismo fragmento genómico, aunque pueden estar separadas por una secuencia que no

codifica un codón de la región V, por ejemplo, pueden estar separadas por una secuencia reguladora, por ejemplo, un promotor u otra secuencia no codificante. En una realización, una secuencia contigua incluye un fragmento genómico que contiene secuencias genómicas dispuestas como se encuentran en un genoma de tipo silvestre.

- 5 La expresión "procedente de" cuando se usa en relación con una región variable "procedente de" un gen o segmento génico enumerado incluye la capacidad para rastrear la secuencia a un segmento génico no reordenado particular o segmentos génicos que se reordenaron para formar un gen que expresa el dominio variable (que representa, cuando sea aplicable, diferencias de corte y empalme y mutaciones somáticas).
- 10 La frase "funcional" cuando se usa con respecto a un segmento génico de región variable o segmento génico de unión se refiere al uso en un repertorio de anticuerpos expresado; por ejemplo, en seres humanos los segmentos génicos V λ 3-1, 4-3, 2-8, etc., son funcionales, mientras que los segmentos génicos V λ 3-2, 3-4, 2-5, etc. no son funcionales.
- 15 Un "locus de cadena pesada" incluye una localización en un cromosoma, por ejemplo, un cromosoma de ratón, en donde en un ratón de tipo silvestre se encuentran secuencias de ADN de región variable de cadena pesada (V H), diversidad de cadena pesada (D H), unión de cadena pesada (J H) y constante de cadena pesada (C H).
- 20 Un "locus κ " incluye una localización en un cromosoma, por ejemplo, un cromosoma de ratón, en donde en un ratón de tipo silvestre se encuentran secuencias de ADN de región variable κ (V κ), unión κ (J κ) y constante κ (C κ).
- 25 Un "locus λ " incluye una localización en un cromosoma, por ejemplo, un cromosoma de ratón, en donde en un ratón de tipo silvestre se encuentran secuencias de ADN de región variable λ (V λ), unión λ (J λ) y constante λ (C λ).
- 30 El término "célula", cuando se usa en relación con la expresión de una secuencia incluye cualquier célula que sea adecuada para expresar una secuencia de ácido nucleico recombinante. Las células incluyen las de procariotas y eucariotas (unicelulares o pluricelulares), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., etc.), células de micobacterias, células fúngicas, células de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etc.), células vegetales, células de insectos (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insectos infectados por baculovirus, *Trichoplusia ni*, etc.), células animales no humanas, células humanas, linfocitos B o fusiones celulares tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana, de mono, de simio, de hámster, de rata o de ratón. En algunas realizaciones, la célula es eucariota y se selecciona de las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), célula retiniana, Vero, CV1, riñón (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (por ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula de tumor y una línea celular procedente de una célula anteriormente mencionada. En algunas realizaciones, la célula comprende uno o más genes víricos, por ejemplo, una célula retiniana que expresa un gen vírico (por ejemplo, una célula PER.C6™).
- 35 La expresión "región determinante de complementariedad", o el término "CDR", incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de genes de inmunoglobulina de un organismo que normalmente (es decir, en un animal de tipo silvestre) aparece entre dos regiones marco conservadas en una región variable de una cadena ligera o pesada de una molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo o un receptor de linfocitos T). Una CDR puede estar codificada, por ejemplo, por una secuencia de línea germinal o una secuencia reordenada o no reordenada y, por ejemplo, por un linfocito B o un linfocito T sin exposición previa o maduro. En algunas circunstancias (por ejemplo, para una CDR3), las CDR pueden estar codificadas por dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de línea germinal) que no son contiguas (por ejemplo, en una secuencia de ácido nucleico no reordenada) pero son contiguas en una secuencia de ácido nucleico de linfocitos B, por ejemplo, como resultado de corte y empalme o conexión de las secuencias (por ejemplo, recombinación de V-D-J para formar una CDR3 de cadena pesada).
- 40 La expresión "segmento génico" o "segmento" incluye referencia a un segmento génico de inmunoglobulina V (ligera o pesada) o D o J (ligera o pesada), que incluye secuencias no reordenadas en loci de inmunoglobulina (por ejemplo, en seres humanos y ratones) que pueden participar en un reordenamiento (mediado, por ejemplo, por recombinasas endógenas) para formar una secuencia V/J o V/D/J reordenada. A menos que se indique otra cosa, los segmentos V, D y J comprenden secuencias señal de recombinación (RSS) que permiten la recombinación V/J o recombinación V/D/J según la norma 12/23. A no ser que se indique otra cosa, los segmentos comprenden además secuencias con las que se asocian en la naturaleza o equivalentes funcionales de las mismas (por ejemplo, para segmentos V promotor o promotores y líder o líderes).
- 45 La expresión "no reordenado" incluye el estado de un locus de inmunoglobulina en donde los segmentos génicos V y segmentos génicos J (para cadenas pesadas, también segmentos génicos D) se mantienen por separado pero son capaces de unirse para formar un gen de V(D)J reordenado que comprende un único V, (D), J del repertorio de V(D)J.
- 50 Se entiende que la expresión "intervalo micromolar" indica 1-999 micromolar; se entiende que la expresión "intervalo nanomolar" significa 1-999 nanomolar; se entiende que la expresión "intervalo picomolar" significa 1-999 picomolar.

Se entiende que la expresión "animales no humanos" incluye cualquier animal no humano tal como ciclóstomos, peces óseos, peces cartilaginosos tales como tiburones y rayas, anfibios, reptiles, mamíferos y aves. Los animales no humanos adecuados incluyen mamíferos. Los mamíferos adecuados incluyen primates no humanos, cabras, ovejas, cerdos, perros, vacas y roedores. Los animales no humanos adecuados se seleccionan de la familia de los roedores incluyendo rata y ratón. Los animales no humanos proporcionados por la invención son ratones.

El ratón como un modelo genético se ha visto mejorado en gran medida por tecnologías transgénicas y de desactivación, que han permitido el estudio de los efectos de la sobreexpresión dirigida o supresión de genes específicos. A pesar de todas sus ventajas, el ratón aún presenta obstáculos genéticos que lo hacen un modelo imperfecto para enfermedades humanas y una plataforma imperfecta para ensayar productos terapéuticos humanos o fabricarlos. En primer lugar, aunque aproximadamente el 99 % de los genes humanos tienen un homólogo de ratón (Waterston, R. H. *et al.* (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562), con frecuencia los productos terapéuticos potenciales no tienen reacción cruzada, o reaccionan de forma cruzada inadecuadamente, con ortólogos de ratón de las dianas humanas pretendidas. Para evitar este problema, los genes diana seleccionados pueden "humanizarse", es decir, el gen de ratón puede eliminarse y reemplazarse por la secuencia génica ortóloga humana correspondiente (por ejemplo, documentos US 6.586.251, US 6.596.541 y US 7.105.348). Inicialmente, los intentos de humanizar genes de ratón mediante una estrategia de "humanización de desactivación más transgénesis" implicaban cruzar un ratón que portaba una supresión (es decir, desactivación) del gen endógeno con un ratón que portaba un transgén humano integrado de forma aleatoria (véase, por ejemplo, Bril, WS *et al.* (2006) Tolerance to factor VIII in a transgenic mouse expressing human factor VIII cDNA carrying an Arg(593) to Cys substitution. *Thromb Haemost* 95, 341-347; Homanics, G. E. *et al.* (2006) Production and characterization of murine models of classic and intermediate maple syrup urine disease. *BMC Med Genet* 7, 33; Jamsai, D. *et al.* (2006) A humanized BAC transgenic/knockout mouse model for HbE/beta-thalassemia. *Genomics* 88(3): 309-15; Pan, Q. *et al.* (2006) Different role for mouse and human CD3delta/epsilon heterodimer in preT cell receptor (preTCR) function: human CD3delta/epsilon heterodimer restores the defective preTCR function in CD3gamma- and CD3gammadelta-deficient mice. *Mol Immunol* 43, 1741-1750). No obstante esos intentos se vieron obstaculizados por limitaciones de tamaño; las tecnologías de desactivación convencionales no eran suficientes para reemplazar directamente grandes genes de ratón con sus homólogos genómicos humanos grandes. Un enfoque sencillo de reemplazo homólogo directo, en el que un gen de ratón endógeno se reemplaza directamente por el gen homólogo humano en la misma localización genética precisa del gen de ratón (es decir, en el locus de ratón endógeno) se ha intentado en pocas ocasiones debido a las dificultades técnicas. Hasta ahora, los intentos de reemplazo directo han implicado procedimientos elaborados y arduos, limitando de este modo la longitud de material genético que podría manipularse y la precisión con la que podría manipularse.

Los transgenes de inmunoglobulina humana introducidos de forma exógena se reordenan en linfocitos B precursores en ratones (Alt, F. W., Blackwell, T. K., y Yancopoulos, G. D. (1985). Immunoglobulin genes in transgenic mice. *Trends Genet* 1, 231-236). Este hallazgo se aprovechó modificando por ingeniería genética ratones usando el enfoque de desactivación más transgénesis para expresar anticuerpos humanos (Green, L. L. *et al.* (1994) Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* 7, 13-21; Lonberg, N. (2005). Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* 23, 1117-1125; Lonberg, N. *et al.* (1994) Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368, 856-859; Jakobovits, A. *et al.* (2007) From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotechnol* 25, 1134-1143). Los loci de cadena pesada y cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón endógenos se inactivaron en estos ratones mediante supresión dirigida de partes pequeñas pero críticas de cada locus endógeno, seguido de introducción de loci de genes de inmunoglobulina humanos como transgenes grandes integrados de forma aleatoria, como se ha descrito anteriormente, o minicromosomas (Tomizuka, K. *et al.* (2000) Double *trans*-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 722-727). Dichos ratones representaron un avance importante en la ingeniería genética; los anticuerpos monoclonales completamente humanos aislados de los mismos produjeron un potencial terapéutico prometedor para tratar una diversidad de enfermedades humanas (Gibson, T.B. *et al.* (2006) Randomized phase III trial results of panitumumab, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 6, 29-31; Jakobovits *et al.*, 2007; Kim, Y.H. *et al.* (2007) Clinical efficacy of zanolimumab (HuMax-CD4): two Phase II studies in refractory cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 109(11):4655-62; Lonberg, 2005; Maker, A.V. *et al.* (2005) Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. *Ann Surg Oncol* 12, 1005-1016; McClung, M.R., Lewiecki, E.M. *et al.* (2006) Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 354, 821-831). No obstante, como se ha analizado anteriormente, estos ratones muestran desarrollo de linfocitos B afectado y deficiencias inmunitarias en comparación con ratones de tipo silvestre. Dichos problemas limitan potencialmente la capacidad de los ratones para apoyar una respuesta humoral vigorosa y, en consecuencia, generan anticuerpos completamente humanos contra algunos antígenos. Las deficiencias pueden deberse a: (1) funcionalidad ineficaz debido a la introducción aleatoria de los transgenes de inmunoglobulina humana y expresión incorrecta resultante debida a una falta de elementos de control cadena arriba y cadena abajo (Garrett, F.E. *et al.* (2005) Chromatin architecture near a potential 3' end of the igh locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and *in vivo* occupancy at CTCF sites. *Mol Cell Biol* 25, 1511-1525; Manis, J.P. *et al.* (2003) Elucidation of a downstream

boundary of the 3' IgH regulatory region. *Mol Immunol* 39, 753-760; Pawlitzky, I. *et al.* (2006) Identification of a candidate regulatory element within the 5' flanking region of the mouse IgH locus defined by pro-B cell-specific hypersensitivity associated with binding of PU.1, Pax5, and E2A. *J Immunol* 176, 6839-6851); (2) interacciones ineficaces entre especies entre dominios constantes humanos y componentes de ratón del complejo de señalización del receptor de linfocitos B en la superficie celular, que pueden alterar procesos de señalización necesarios para la maduración normal, proliferación y supervivencia de linfocitos B (Hombach, J. *et al.* (1990) Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* 343, 760-762); y (3) interacciones ineficaces entre especies entre inmunoglobulinas humanas solubles y receptores de Fc de ratón que podrían reducir la selección de afinidad (Rao, S.P. *et al.* (2002) Differential expression of the inhibitory IgG Fc receptor FcγRIIB on germinal center cells: implications for selection of high-affinity B cells. *J Immunol* 169, 1859-1868) y concentraciones de inmunoglobulina en suero (Brambell, F. W. *et al.* (1964). A Theoretical Model of Gamma-Globulin Catabolism. *Nature* 203, 1352-1354; Junghans, R. P., y Anderson, C. L. (1996). The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5512-5516; Rao *et al.*, 2002; Hjelm, F. *et al.* (2006) Antibody-mediated regulation of the immune response. *Scand J Immunol* 64, 177-184; Nimmerjahn, F. y Ravetch, J. V. (2007). Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol* 96, 179-204). Estas deficiencias pueden corregirse mediante humanización in situ de solamente las regiones variables de los loci de inmunoglobulina de ratón en sus localizaciones naturales en los loci de cadena pesada y ligera endógenos. Esto daría como resultado de hecho ratones que realizan anticuerpos "quiméricos inversos" (es decir, V humano: C de ratón) que tendrían capacidad de interacción normal y selección con el ambiente de ratón basándose en la conservación de regiones constantes de ratón. Además dichos anticuerpos quiméricos inversos pueden reformarse fácilmente en anticuerpos completamente humanos para fines terapéuticos.

Pueden prepararse animales modificados genéticamente que comprenden un reemplazo en el locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno con secuencias de inmunoglobulina heterólogas (por ejemplo, de otras especies) junto con reemplazos en loci de cadena ligera de inmunoglobulina endógenos o junto con transgenes de cadena ligera de inmunoglobulina (por ejemplo, transgenes de cadena ligera de inmunoglobulina quiméricos o completamente humanos completamente de ratón, etc.). La especie de la que proceden las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina heterólogas puede variar ampliamente; como con secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina empleadas en reemplazos de secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina o transgenes de cadena ligera de inmunoglobulina.

Se obtienen secuencias de ácido nucleico de región variable de inmunoglobulina, por ejemplo segmentos V, D y/o J de un ser humano o un animal no humano. Los animales no humanos adecuados para proporcionar segmentos V, D y/o J incluyen, por ejemplo peces óseos, peces cartilaginosos tales como tiburones y rayas, anfibios, reptiles, mamíferos, aves (por ejemplo, pollos). Los animales no humanos incluyen, por ejemplo, mamíferos. Los mamíferos incluyen, por ejemplo, primates no humanos, cabras, ovejas, cerdos, perros, bóvidos (por ejemplo, vaca, toro, búfalo), ciervos, camellos, hurones y roedores y primates no humanos (por ejemplo, chimpancés, orangutanes, gorilas, titíes, monos rhesus, babuinos). Los animales no humanos adecuados se seleccionan de la familia de los roedores incluyendo ratas, ratones y hámsteres. En una realización, los animales no humanos son ratones. Como resulta evidente a partir del contexto, pueden usarse diversos animales no humanos como fuentes de dominios variables o segmentos génicos de región variable (por ejemplo, tiburones, rayas, mamíferos (por ejemplo, camellos, roedores tales como ratones y ratas).

Según el contexto, también se usan animales no humanos como fuentes de secuencias de región constante para usar en relación con secuencias o segmentos variables, por ejemplo, pueden usarse secuencias constantes de roedor en transgenes unidos operativamente con secuencias variables humanas o no humanas (por ejemplo, secuencias variables humanas o de primates no humanos unidas operativamente con, por ejemplo, secuencias constantes de roedor, por ejemplo, ratón o rata o hámster). Por tanto, en diversas realizaciones, se unen operativamente segmentos V, D y/o J humanos con secuencias génicas de región constante de roedor (por ejemplo, ratón o rata o hámster). En algunas realizaciones, los segmentos V, D y/o J humanos (o uno o más genes de VDJ o VJ reordenados) se unen operativamente o se fusionan con una secuencia de gen de región constante de ratón, rata o hámster en, por ejemplo, un transgén integrado en un locus que no está en un locus de inmunoglobulina endógeno.

También se desvela un ratón que comprende un reemplazo de segmentos génicos V_H, D_H y J_H en un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno con uno o más segmentos V_H, D_H y J_H humanos, en donde el o los segmentos V_H, D_H y J_H humanos se unen operativamente con un gen constante de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno; en donde el ratón comprende un transgén en un locus distinto de un locus de inmunoglobulina endógeno, en donde el transgén comprende un segmento V_L humano y J_L humano no reordenado o reordenado unido operativamente con una región constante de ratón o rata o humano.

En una realización específica, se proporciona un ratón que comprende una inserción de uno o más segmentos génicos V_H, D_H y J_H en un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno. En una realización, la inserción es cadena arriba de un gen constante de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno; en una realización, la inserción es cadena abajo de un segmento génico variable (V) endógeno; en una realización, la inserción es cadena abajo de un segmento génico de diversidad (D) endógeno; en una realización, la inserción es cadena abajo de un segmento génico de unión (J) endógeno. En diversas realizaciones, la inserción es tal que el o los segmentos génicos V_H, D_H y J_H

humanos se sitúan en unión operativa con uno o más genes constantes de cadena pesada endógenos.

Se describe un método para un reemplazo genético *in situ* grande de los loci de genes variables de inmunoglobulina de línea germinal de ratón con loci de genes variables de inmunoglobulina de línea germinal humanos manteniendo al mismo tiempo la capacidad de los ratones para generar descendencia. Específicamente, se describe el reemplazo preciso de seis megabases del loci de genes variables de inmunoglobulina tanto de cadena pesada como de cadena ligera κ de ratón con sus homólogos humanos dejando al mismo tiempo las regiones constantes de ratón intactas. Como resultado, se han creado ratones que tienen un reemplazo preciso de su repertorio variable de inmunoglobulina de línea germinal completo con secuencias variables de inmunoglobulina de línea germinal humanas, manteniendo al mismo tiempo regiones constantes de ratón. Las regiones variables humanas se unen con regiones constantes de ratón para formar loci de inmunoglobulina quiméricos humanos-de ratón que se reordenan y expresan a niveles fisiológicamente apropiados. Los anticuerpos expresados son "quimeras inversas", es decir, comprenden secuencias de región variable humanas y secuencias de región constante humanas. Estos ratones que tienen regiones variables de inmunoglobulina humanizadas que expresan anticuerpos que tienen regiones variables humanas y regiones constantes de ratón se denominan ratones VELOCIMMUNE®.

Los ratones humanizados VELOCIMMUNE® muestran un sistema inmunitario humoral completamente funcional que es esencialmente indistinguible del de ratones de tipo silvestre. Presentan poblaciones de células normales en todos los estadios del desarrollo de linfocitos B. Muestran morfología de órganos linfoides normal. Las secuencias de anticuerpos de ratones VELOCIMMUNE® muestran reordenación de V(D)J normal y frecuencias de hipermutación somática normales. Las poblaciones de anticuerpos en estos ratones reflejan distribuciones de isotipos que resultan de cambio de clase normal (por ejemplo, cambio en *cis* de isotipo normal). La inmunización de ratones VELOCIMMUNE® da como resultado respuestas inmunitarias humorales robustas que generan un gran repertorio de anticuerpos diversos que tiene dominios variables de inmunoglobulina humanos adecuados como candidatos terapéuticos. Esta plataforma proporciona una fuente abundante de secuencias de región variable de inmunoglobulina humana de afinidad madurada de forma natural para realizar anticuerpos farmacéuticamente aceptables y otras proteínas de unión a antígeno.

Lo que permite la preparación de ratones VELOCIMMUNE® es el reemplazo preciso de secuencias variables de inmunoglobulina de ratón con secuencias variables de inmunoglobulina humana. Aun así incluso un reemplazo preciso de secuencias de inmunoglobulina de ratón endógenas en loci de cadena pesada y ligera con secuencias de inmunoglobulina humanas equivalentes, mediante ingeniería recombinante secuencial de tramos muy grandes de secuencias de inmunoglobulina humana puede presentar ciertos retos debido a la evolución divergente de los loci de inmunoglobulina entre ratón y hombre. Por ejemplo, las secuencias intergénicas intercaladas entre los loci de inmunoglobulina no son idénticas entre ratones y seres humanos y, en algunas circunstancias, pueden no ser funcionalmente equivalentes. Las diferencias entre ratones y seres humanos en sus loci de inmunoglobulina aún puede dar como resultado anomalías en ratones humanizados, particularmente cuando se humanizan o manipulan determinadas partes de loci de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón endógenos. Algunas modificaciones en loci de cadena pesada de inmunoglobulina son deletéreas. Las modificaciones deletéreas pueden incluir, por ejemplo, pérdida de la capacidad de los ratones modificados para aparearse y producir descendencia. En diversas realizaciones, la introducción por ingeniería genética de secuencias de inmunoglobulina humanas en el genoma de un ratón incluye métodos que mantienen secuencias endógenas que cuando están ausentes en cepas de ratón modificadas son deletéreas. Los efectos deletéreos ilustrativos pueden incluir la incapacidad para propagar cepas modificadas, pérdida de función de genes esenciales, incapacidad para expresar polipéptidos, etc. Dichos efectos deletéreos pueden estar relacionados directa o indirectamente con la modificación por ingeniería genética en el genoma del ratón.

Se realizó un reemplazo *in situ*, preciso, a gran escala, de seis megabases de las regiones variables de los loci de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón (V_H - D_H - J_H y V_k - J_k) con las 1,4 megabases correspondientes de secuencias genómicas humanas, dejando al mismo tiempo las secuencias de ratón flanqueantes intactas y funcionales dentro de los loci híbridos, incluyendo todos los genes de cadena constante de ratón y regiones de control de la transcripción del locus (FIGURA 1A y FIGURA 1B). Específicamente, las secuencias de genes de V_H , D_H , J_H , V_k y J_k humanas se introdujeron mediante inserción por etapas de 13 vectores de dirección BAC quiméricos que portaban fragmentos solapantes de los loci variables de línea germinal humanos en células ES de ratón usando tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos n.º 6.586.251 y Valenzuela, D. M. *et al.* (2003). High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nat Biotechnol* 21, 652-659).

La humanización de los genes de inmunoglobulina de ratón representa la mayor modificación genética del genoma de ratón hasta la fecha. Aunque intentos previos con transgenes de inmunoglobulina humana integrados aleatoriamente han tenido cierto éxito (analizado anteriormente), el reemplazo directo de los genes de inmunoglobulina de ratón con sus homólogos humanos aumenta drásticamente la eficacia con la que pueden generarse eficazmente anticuerpos completamente humanos en ratones por lo demás normales. Además, dichos ratones muestran una diversidad drásticamente aumentada de anticuerpos completamente humanos que puede obtenerse después de inmunización con prácticamente cualquier antígeno, en comparación con ratones que portan loci endógenos inactivados y transgenes de anticuerpos completamente humanos. Múltiples versiones de loci humanizados, reemplazados,

muestran niveles completamente normales de linfocitos B maduros e inmaduros, a diferencia de ratones con transgenes humanos integrados de forma aleatoria, que muestran poblaciones de linfocitos B significativamente reducidas en diversos estadios de diferenciación. Aunque los intentos de aumentar el número de segmentos génicos humanos en ratones transgénicos humanos han reducido dichos defectos, los repertorios de inmunoglobulinas expandidos no han corregido completamente las reducciones de poblaciones de linfocitos B en comparación con ratones de tipo silvestre.

A pesar de la función inmunitaria humoral casi de tipo silvestre observada en ratones con loci de inmunoglobulina reemplazados (es decir, ratones VELOCIMMUNE®), se afrontan otros retos cuando se emplea un reemplazo directo de la inmunoglobulina que no se afrontan en algunos enfoques que emplean transgenes integrados de forma aleatoria. Las diferencias en la composición genética de los loci de inmunoglobulina entre ratones y seres humanos han conducido al descubrimiento de secuencias beneficiosas para la propagación de ratones con segmentos génicos de inmunoglobulina reemplazados. Específicamente, los genes de ADAM de ratón localizados dentro del locus de inmunoglobulina endógeno están presentes de forma óptima en ratones con loci de inmunoglobulina reemplazados, debido a su papel en la fertilidad.

Localización genómica y función de ADAM6 de ratón

Los ratones macho que carecen de la capacidad para expresar cualquier proteína ADAM6 funcional muestran sorprendentemente un defecto en la capacidad de los ratones para aparearse y para generar descendencia. Los ratones carecen de la capacidad para expresar una proteína ADAM6 funcional en virtud del reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos de región variable de inmunoglobulina de ratón con segmentos génicos de región variable humana. Se produce la pérdida de función de ADAM6 debido a que el locus de ADAM6 está localizado en una región del locus de gen de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón endógeno, próximo al extremo 3' del locus del segmento génico V_H que está cadena arriba de los segmentos génicos D_H . Para criar ratones que son homocigotos para un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos variables de cadena pesada de ratón endógenos con segmentos génicos variables de cadena pesada humana, es generalmente un enfoque incómodo juntar machos y hembras que son cada uno homocigotos para el reemplazo y esperar un apareamiento productivo. Las camadas con éxito son de baja frecuencia y tamaño. En su lugar, se han empleado machos heterocigotos para el reemplazo para aparearse con hembras homocigotas para el reemplazo para generar descendencia que es heterocigota para el reemplazo, y después criar un ratón homocigoto a partir de la misma. Los inventores han determinado que la causa probable de la pérdida de fertilidad en los ratones macho es la ausencia en ratones macho homocigotos de una proteína ADAM6 funcional.

En diversos aspectos, los ratones macho que comprenden un gen de ADAM6 dañado (es decir, no funcional o marginalmente funcional) muestran una reducción o eliminación de la fertilidad. Debido a que en ratones (y otros roedores) el gen de ADAM6 está localizado en el locus de cadena pesada de inmunoglobulina, los inventores han determinado que para propagar ratones, o crear y mantener una cepa de ratones, que comprenden un locus de cadena pesada de inmunoglobulina reemplazado, se emplean diversos esquemas de cría o propagación modificados. La baja fertilidad, o infertilidad, de ratones macho homocigotos para un reemplazo del locus de gen variable de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno hace el mantenimiento de dicha modificación en una cepa de ratón difícil. El mantenimiento de la cepa comprende evitar problemas de infertilidad mostrados por ratones macho homocigotos para el reemplazo.

Se desvela un método para mantener una cepa de ratón como se describe en el presente documento. No es necesario que la cepa de ratón comprenda una secuencia de ADAM6 ectópica, y en diversas realizaciones la cepa de ratón es homocigota o heterocigota para una desactivación (por ejemplo, una desactivación funcional) de ADAM6.

La cepa de ratón puede comprender una modificación de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que da como resultado una reducción o pérdida de fertilidad en un ratón macho. La modificación puede comprender una supresión de una región reguladora y/o una región codificante de un gen de ADAM6. La modificación puede comprender una modificación de un gen de ADAM6 endógeno (región reguladora y/o codificante) que reduce o elimina la fertilidad de un ratón macho que comprende la modificación; la modificación puede reducir o eliminar la fertilidad de un ratón macho que es homocigoto para la modificación.

La cepa de ratón puede ser homocigota o heterocigota para una desactivación (por ejemplo, una desactivación funcional) o una supresión de un gen de ADAM6.

La cepa de ratón puede mantenerse aislando de un ratón que es homocigoto o heterocigoto para la modificación una célula, y empleando la célula donante en un embrión hospedador, y gestando el embrión hospedador y la célula donante en una madre sustituta, y obtener de la madre sustituta una descendencia que comprende la modificación genética. En una realización, la célula donante es una célula ES. La célula donante puede ser una célula pluripotente, por ejemplo, una célula pluripotente inducida.

La cepa de ratón puede mantenerse aislando de un ratón que es homocigoto o heterocigoto para la modificación una secuencia de ácido nucleico que comprende la modificación e introduciendo la secuencia de ácido nucleico en un

núcleo de hospedador y gestando una célula que comprende la secuencia de ácido nucleico y el núcleo de hospedador en un animal adecuado. La secuencia de ácido nucleico puede introducirse en un embrión de oocito hospedador.

5 La cepa de ratón puede mantenerse aislando de un ratón que es homocigoto o heterocigoto para la modificación un núcleo e introduciendo el núcleo en una célula hospedadora y gestando el núcleo y la célula hospedadora en un animal adecuado para obtener una descendencia que es homocigota o heterocigota para la modificación.

10 La cepa de ratón puede mantenerse empleando fecundación *in vitro* (FIV) de un ratón hembra (de tipo silvestre, homocigoto para la modificación o heterocigoto para la modificación) empleando un espermatozoide de un ratón macho que comprende la modificación genética. El ratón macho puede ser heterocigoto para la modificación genética. El ratón macho puede ser homocigoto para la modificación genética.

15 La cepa de ratón puede mantenerse criando un ratón macho que es heterocigoto para la modificación genética con un ratón hembra para obtener descendencia que comprende una modificación genética, identificando una descendencia macho y una hembra que comprende la modificación genética y empleando un macho que es heterocigoto para la modificación genética en una cría con una hembra que es de tipo silvestre, homocigota o heterocigota para la modificación genética para obtener descendencia que comprende la modificación genética. La etapa de criar un macho heterocigoto para la modificación genética con una hembra de tipo silvestre, una hembra heterocigota para la modificación genética o una hembra homocigota para la modificación genética puede repetirse para mantener la modificación genética en la cepa de ratón.

20 Se desvela un método para mantener una cepa de ratón que comprende un reemplazo de un locus de gen variable de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno con una o más secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina humana, que comprende criar la cepa de ratón para generar ratones macho heterocigotos, en donde los ratones macho heterocigotos se crían para mantener la modificación genética en la cepa. No es necesario que la cepa se mantenga por ninguna cría de un macho homocigoto con una hembra de tipo silvestre, o una hembra homocigota o heterocigota para la modificación genética.

25 La proteína ADAM6 es un miembro de la familia de proteínas ADAM, donde ADAM es un acrónimo de Desintegrina y Metaloproteasa A. La familia de proteínas ADAM es grande y diversa, con diversas funciones incluyendo adhesión celular. Algunos miembros de la familia ADAM están implicados en la espermatogénesis y fecundación. Por ejemplo, ADAM2 codifica una subunidad de la proteína fertilina, que está implicada en las interacciones espermatozoide-óvulo. ADAM3, o cirtestina, parece necesario para la unión del espermatozoide con la zona pelúcida. La ausencia de ADAM2 o ADAM3 da como resultado infertilidad. Se ha postulado que ADAM2, ADAM3 y ADAM6 forman un complejo en la superficie de células espermáticas de ratón.

30 El gen de ADAM6 humano, normalmente encontrado entre los segmentos génicos V_H humanos V_{H1-2} y V_{H6-1} , parece ser un pseudogén (Figura 12). En ratones, hay dos genes de ADAM6, ADAM6a y ADAM6b, que se encuentran en una región intergénica entre los segmentos génicos V_H y D_H de ratón, y en el ratón los genes de ADAM6a y ADAM6b están orientados en orientación transcripcional opuesta a la de los elementos génicos de inmunoglobulina circundantes (FIGURA 12). En ratones, un locus de ADAM6 funcional es necesario aparentemente para fecundación normal. Entonces, un locus o secuencia de ADAM6 funcional se refiere a un locus o secuencia de ADAM6 que puede complementar, o rescatar, la fecundación drásticamente reducida mostrada en ratones macho con loci de ADAM6 endógenos ausentes o no funcionales.

35 La posición de la secuencia intergénica en ratones que codifica ADAM6a y ADAM6b hace a la secuencia intergénica susceptible a modificación cuando modifica una cadena pesada de ratón endógena. Cuando se suprimen o reemplazan segmentos génicos V_H , o cuando se suprimen o reemplazan segmentos génicos D_H , existe una alta probabilidad de que un ratón resultante muestre un grave déficit de fertilidad. Para compensar el déficit, el ratón se modifica para incluir una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que complementará la pérdida de actividad de ADAM6 debido a una modificación de locus de ADAM6 de ratón endógeno. En diversas realizaciones, la secuencia de nucleótidos complementaria es una que codifica un ADAM6a de ratón, un ADAM6b de ratón o un homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo que rescata el déficit de fertilidad. También se describen métodos para conservar el locus de ADAM6 endógeno, haciendo al mismo tiempo a las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina endógenas que flanquean el locus de ADAM6 de ratón incapaces de reordenarse para codificar una región variable de cadena pesada endógena funcional. Los métodos alternativos ejemplares incluyen manipulación de grandes partes de cromosomas de ratón que sitúan los loci de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos de tal manera que sean incapaces de reordenarse para codificar una región variable de cadena pesada funcional que esté unida operativamente con un gen constante de cadena pesada endógeno. Los métodos pueden incluir inversiones y/o translocaciones de fragmentos cromosómicos de ratón que contienen segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos.

[Eliminado]

65 La secuencia de nucleótidos que rescata la fertilidad puede acoplarse con un promotor inducible para facilitar la expresión óptima en las células y/o tejidos apropiados, por ejemplo, tejidos reproductores. Los promotores inducibles

ilustrativos incluyen promotores activados por medios físicos (por ejemplo, promotor de choque térmico) y/o químicos (por ejemplo, IPTG o tetraciclina). Además, la expresión de la secuencia de nucleótidos puede estar ligada a otros genes para conseguir la expresión en estadios específicos del desarrollo o dentro de tejidos específicos. Dicha expresión puede conseguirse colocando la secuencia de nucleótidos en unión operativa con el promotor de un gen expresado en un estadio del desarrollo específico. Por ejemplo, se colocan secuencias de inmunoglobulina de una especie introducidas por ingeniería genética en el genoma de una especie hospedadora en unión operativa con una secuencia promotora de un gen de CD19 (un gen específico de linfocitos B) de la especie hospedadora. Se consigue expresión específica de linfocitos B en estadios del desarrollo precisos cuando se expresan inmunoglobulinas.

Además, la expresión de la secuencia de nucleótidos puede estar ligada a otros genes para conseguir expresión en estadios específicos del desarrollo o dentro de tejidos específicos. Dicha expresión puede conseguirse colocando la secuencia de nucleótidos en unión operativa con el promotor de un gen expresado en un estadio del desarrollo específico. Por ejemplo, se sitúan secuencias de inmunoglobulina de una especie introducidas por ingeniería genética en el genoma de una especie hospedadora en unión operativa con una secuencia promotora de un gen de CD19 (un gen específico de linfocitos B) de la especie hospedadora. Se consigue expresión específica de linfocitos B en estadios del desarrollo precisos cuando se expresan inmunoglobulinas.

Otro método más para conseguir expresión robusta de una secuencia de nucleótidos insertada es emplear un promotor constitutivo. Los promotores constitutivos ilustrativos incluyen SV40, CMV, UBC, EF1A, PGK y CAGG. De una manera similar, la secuencia de nucleótidos deseada se coloca en unión operativa con un promotor constitutivo seleccionado, que proporciona alto nivel de expresión de la proteína o proteínas codificadas por la secuencia de nucleótidos.

Se entiende que el término "ectópico" incluye un desplazamiento, o una ubicación en una posición que no se encuentra normalmente en la naturaleza (por ejemplo, ubicación de una secuencia de ácido nucleico en una posición que no es la misma posición en la que se encuentra la secuencia de ácido nucleico en un ratón de tipo silvestre). El término se usa en el sentido de que su objeto esté fuera de su posición normal, o apropiada. Por ejemplo, la expresión "una secuencia de nucleótidos ectópica que codifica ..." se refiere a una secuencia de nucleótidos que aparece en una posición en la que no se encuentra normalmente en el ratón. Por ejemplo, en el caso de una secuencia de nucleótidos ectópica que codifica una proteína ADAM6 de ratón (o un ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que proporciona el mismo beneficio de fertilidad o uno similar en ratones macho), la secuencia puede colocarse en una posición diferente en el genoma del ratón que en la que se encuentra normalmente en un ratón de tipo silvestre. En dichos casos, se crearán uniones de secuencias nuevas de la secuencia de ratón colocando la secuencia en una posición diferente en el genoma del ratón que en un ratón de tipo silvestre. Un homólogo u ortólogo funcional de ADAM6 de ratón es una secuencia que confiere un rescate de pérdida de fertilidad (por ejemplo, pérdida de la capacidad de un ratón macho para generar descendencia por apareamiento) que se observa en un ratón ADAM6^{-/-}. Los homólogos u ortólogos funcionales incluyen proteínas que tienen al menos aproximadamente el 89 % de identidad o más, por ejemplo, hasta 99 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de ADAM6a y/o con la secuencia de aminoácidos de ADAM6b, y que pueden complementar o rescatar la capacidad para aparearse con éxito, de un ratón que tiene un genotipo que incluye una supresión o desactivación de ADAM6a y/o ADAM6b.

La posición ectópica puede estar en cualquier parte (por ejemplo, con inserción aleatoria de un transgén que contiene una secuencia de ADAM6 de ratón), o puede estar, por ejemplo, en una posición que se aproxima a (pero no es exactamente la misma que) su localización en un ratón de tipo silvestre (por ejemplo, en un locus de inmunoglobulina de ratón endógeno modificado, pero cadena arriba o cadena abajo de su posición natural, por ejemplo, en un locus de inmunoglobulina modificado pero entre diferentes segmentos génicos, o en una posición diferente en una secuencia intergénica V-D de ratón). Un ejemplo de una ubicación ectópica es mantener la posición normalmente hallada en ratones de tipo silvestre en el locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno haciendo a los segmentos génicos de cadena pesada endógenos circundantes incapaces de reordenarse para codificar una cadena pesada funcional que contiene una región constante de cadena pesada endógena. En este ejemplo, esto puede conseguirse mediante inversión del fragmento cromosómico que contiene los loci variables de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos, por ejemplo usando sitios de recombinación específica modificados por ingeniería genética situados en posiciones que flanquean el locus de región variable. Por tanto, tras la recombinación los loci de región variable de cadena pesada endógenos se sitúan a una gran distancia de los genes de región constante de cadena pesada endógenos evitando de este modo el reordenamiento para codificar una cadena pesada funcional que contiene una región constante de cadena pesada endógena. Otros métodos ejemplares para conseguir silenciamiento funcional del locus de gen variable de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno manteniendo al mismo tiempo un locus de ADAM6 funcional resultarán evidentes para los expertos tras leer la presente divulgación y/o en combinación con métodos conocidos en la técnica. Con dicha ubicación del locus de cadena pesada endógeno, los genes de ADAM6 endógenos se mantienen y el locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno se silencia funcionalmente.

Otro ejemplo de una ubicación ectópica es ubicación dentro de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada. Por ejemplo, un ratón que comprende un reemplazo de uno o más segmentos génicos V_H endógenos con segmentos génicos V_H humanos, en donde el reemplazo retira una secuencia de ADAM6 endógena, puede modificarse por ingeniería genética para tener una secuencia de ADAM6 de ratón localizada dentro de la secuencia que contiene los segmentos génicos V_H humanos. La modificación resultante generaría una secuencia de ADAM6 de ratón (ectópica) en una secuencia génica humana, y la ubicación (ectópica) de la secuencia de ADAM6 de ratón en la secuencia génica humana puede aproximarse a la posición del pseudogén de ADAM6 humano (es decir, entre dos segmentos V) o puede aproximarse a la posición de la secuencia de ADAM6 de ratón (es decir, dentro de la región intergénica V-D). Los puntos de unión de secuencia resultantes creados por la unión de secuencia de ADAM6 de ratón (ectópica) en o adyacente a una secuencia génica humana (por ejemplo, una secuencia génica de inmunoglobulina) dentro de la línea germinal del ratón serían novedosos en comparación con la misma posición o una similar en el genoma de un ratón de tipo silvestre.

Se describen ratones que carecen de un ADAM6 u ortólogo u homólogo del mismo, en donde la carencia hace a los ratones infértiles, o reduce sustancialmente la fertilidad de los ratones. La carencia de ADAM6 u ortólogo u homólogo del mismo puede deberse a una modificación de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno. Una reducción sustancial en la infertilidad es, por ejemplo, una reducción en la infertilidad (por ejemplo, frecuencia de cría, crías por camada, camadas por año, etc.) de aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % o más. Un rescate de la fertilidad en parte sustancial es, por ejemplo, una restauración de la fertilidad de modo que el ratón muestre una fertilidad que es al menos 70 %, 80 % o 90 % o más en comparación con un locus de cadena pesada sin modificar (es decir, un animal sin una modificación del gen de ADAM6 u ortólogo u homólogo del mismo).

En un ratón la pérdida de función de ADAM6 puede ser rescatada mediante la adición de un gen de ADAM6 de ratón. En una realización, la pérdida de función de ADAM6 en el ratón es rescatada por la adición de un ortólogo u homólogo de una especie estrechamente relacionada con respecto al ratón, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón de una cepa o especie diferente, una rata de cualquier especie, un roedor; en donde la adición del ortólogo u homólogo al ratón rescata la pérdida de fertilidad debida a pérdida de función de ADAM6 o pérdida de un gen de ADAM6. Se seleccionan ortólogos y homólogos de otras especies, en diversas realizaciones, a partir de una especie relacionada filogenéticamente y, en diversas realizaciones, muestran un porcentaje de identidad con el ADAM6 endógeno (u ortólogo) que es aproximadamente 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 96 % o más o 97 % o más; y que rescatan pérdida de fertilidad relacionada con ADAM6 o (en uno distinto de ratón) ortólogo de ADAM6. Por ejemplo, en una rata macho modificada genéticamente que carece de función de ADAM6 (por ejemplo, una rata con una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina endógena reemplazada con una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana, o una desactivación en la región de cadena pesada de inmunoglobulina de rata), la pérdida de la fertilidad en la rata es rescatada por la adición de un ADAM6 de rata o, en algunas realizaciones, un ortólogo de un ADAM6 de rata (por ejemplo, un ortólogo de ADAM6 de otra cepa o especie de rata o, en una realización, de un ratón).

Se describen ratones modificados genéticamente que no muestran fertilidad o muestran una reducción de la fertilidad debido a modificación de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6 (u ortólogo u homólogo de la misma) o una región reguladora unida operativamente con la secuencia de ácido nucleico, comprenden una secuencia de ácido nucleico que complementa, o restaura, la pérdida de fertilidad cuando la secuencia de ácido nucleico que complementa o restaura la pérdida de fertilidad es de una cepa diferente de la misma especie o de una especie relacionada filogenéticamente. La secuencia de ácido nucleico complementaria puede ser un ortólogo o un homólogo de ADAM6 o fragmento funcional del mismo. El ortólogo u homólogo de ADAM6 complementario o fragmento funcional del mismo puede ser de un animal no humano que está estrechamente relacionado con el ratón

modificado genéticamente que tiene el defecto de fertilidad. Por ejemplo, cuando el animal modificado genéticamente sea un ratón de una cepa particular, un ortólogo u homólogo de ADAM6 o fragmento funcional del mismo puede obtenerse de un ratón de otra cepa, o un ratón de una especie relacionada. En una realización, ya que el animal modificado genéticamente que comprende el defecto de fertilidad es un ratón y por lo tanto, del orden Rodentia, el ortólogo u homólogo de ADAM6 o fragmento funcional del mismo es de otro animal del orden Rodentia.

[Eliminado]

En una realización, el ratón modificado genéticamente es de un miembro de la familia Muridae, y el ortólogo u homólogo de ADAM6 es de una especie diferente de la familia Muridae. En una realización específica, el ortólogo u homólogo de ADAM6 es de una rata, jerbo, ratón espinoso o rata crestada de la familia Muridae.

Se describen uno o más ortólogos u homólogos de ADAM6 de roedor o fragmentos funcionales de los mismos de un roedor en una familia que restauran la fertilidad a un roedor modificado genéticamente de la misma familia que carece de un ortólogo u homólogo de ADAM6 (por ejemplo, Cricetidae (por ejemplo, hámsteres, ratas y ratones del Nuevo Mundo, topillos); Muridae (por ejemplo verdaderos ratones y ratas, jerbos, ratones espinosos, ratas crestadas)).

Los ortólogos, homólogos de ADAM6 y fragmentos de los mismos pueden evaluarse para determinar la funcionalidad determinando si el ortólogo, homólogo o fragmento restaura la fertilidad a un ratón macho modificado genéticamente que carece de actividad de ADAM6 (que comprende una desactivación de ADAM6 o su ortólogo). En diversas realizaciones, la funcionalidad se define como la capacidad de un espermatozoide de un ratón modificado genéticamente que carece de un ADAM6 endógeno u ortólogo u homólogo del mismo para migrar un oviducto y fecundar un óvulo de la misma especie de animal modificado genéticamente.

En diversos aspectos, pueden prepararse ratones que comprenden supresiones o reemplazos del locus de región variable de cadena pesada endógeno o partes del mismo que contienen una secuencia de nucleótidos ectópica que codifica una proteína que confiere beneficios de fecundidad similares a ADAM6 de ratón (por ejemplo, un ortólogo o un homólogo o un fragmento del mismo que es funcional en un ratón macho). La secuencia de nucleótidos ectópica puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que es un homólogo u ortólogo de ADAM6 (o fragmento del mismo) de una cepa de ratón diferente o una especie diferente, por ejemplo, una especie de roedor diferente y que confiere un beneficio en la fertilidad, por ejemplo, mayor número de camadas durante un periodo de tiempo específico y/o mayor número de crías por camada y/o la capacidad de una célula espermática de un ratón macho para atravesar un oviducto de ratón para fecundar un óvulo de ratón.

En una realización, el ADAM6 es un homólogo u ortólogo que es al menos 89 % a 99 % idéntico a una proteína ADAM6 de ratón (por ejemplo, al menos 89 % a 99 % idéntico a ADAM6a de ratón o ADAM6b de ratón). En una realización, la secuencia de nucleótidos ectópicos codifica una o más proteínas seleccionadas de forma independiente de una proteína al menos 89 % idéntica a ADAM6a de ratón, una proteína al menos 89 % idéntica a ADAM6b de ratón y una combinación de las mismas. En una realización, el homólogo u ortólogo es una proteína de rata, hámster, ratón o cobaya que es o se modifica para que sea aproximadamente 89 % o más idéntica a ADAM6a de ratón y/o ADAM6b de ratón. En una realización, el homólogo u ortólogo es o es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a un ADAM6a de ratón y/o ADAM6b de ratón.

En un aspecto, se proporcionan ratones, en donde los ratones comprenden (a) una inserción de uno o más segmentos génicos V λ y J λ humanos cadena arriba de una región constante de cadena ligera kappa de inmunoglobulina de ratón, (b) una inserción de uno o más segmentos génicos V H humano, uno o más D H humanos y uno o más J H humanos cadena arriba de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina no humana, y (c) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAM6 o un fragmento funcional de la misma. En una realización, las regiones constantes de cadena pesada y/o ligera no humanas son regiones constantes de roedor (por ejemplo, seleccionadas de regiones constantes de ratón, rata o hámster).

En una realización, el ratón comprende de al menos 12 a al menos 40 segmentos génicos V λ humanos y al menos un segmento génico J λ humano. En una realización específica, el ratón comprende 12 segmentos génicos V λ humanos y al menos un segmento génico J λ humano. En una realización específica, el ratón comprende 28 segmentos génicos V λ humanos y al menos un segmento génico J λ humano. En una realización, el ratón comprende 40 segmentos génicos V λ humano y al menos un segmento génico J λ humano. En diversas realizaciones, el al menos un segmento génico J λ humano se selecciona de J λ 1, J λ 2, J λ 3 y J λ 7. En una realización específica, el ratón comprende al menos cuatro segmentos génicos J λ humanos. En una realización, los al menos cuatro segmentos génicos J λ humanos comprenden al menos J λ 1, J λ 2, J λ 3 y J λ 7.

En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAM6 o fragmento funcional de la misma es ectópica en el ratón. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAM6 o fragmento funcional de la misma (que es funcional en el ratón) está presente en la misma localización en comparación con un locus de ADAM6 no humano de tipo silvestre. En una realización, la secuencia de nucleótidos codifica una proteína ADAM6 de ratón o fragmento funcional de la misma y está presente en una localización ectópica en el genoma del ratón. La secuencia de nucleótidos codifica una proteína ADAM6 de ratón o fragmento funcional de la misma y está

presente en segmentos génicos de inmunoglobulina que son segmentos génicos de cadena pesada humanos.

En una realización, el ratón carece de un segmento génico V_L y/o J_L de inmunoglobulina endógeno en un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno. En una realización, el ratón comprende segmentos génicos V_L y/o J_L de inmunoglobulina endógenos que son incapaces de reordenarse para formar un dominio V_L de inmunoglobulina en el animal no humano. En una realización, todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_k y J_k de inmunoglobulina endógenos se reemplazan con uno o más segmentos génicos V_λ y J_λ humanos. En una realización, todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_λ y J_λ de inmunoglobulina endógenos se reemplazan con uno o más segmentos génicos V_λ y J_λ humanos. En una realización, todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_L y J_L de inmunoglobulina endógenos son intactos en el animal no humano y el animal no humano comprende uno o más segmentos génicos V_λ humanos y uno o más segmentos génicos J_λ humanos insertados entre los segmentos génicos V_L y/o J_L de inmunoglobulina endógenos y una región constante de cadena ligera de inmunoglobulina endógena. En una realización específica, los segmentos génicos V_L y J_L de inmunoglobulina endógenos intactos se hacen incapaces de reordenarse para formar un dominio V_L de un anticuerpo en el ratón. En diversas realizaciones, el locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno del ratón es un locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina. En diversas realizaciones, el locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno del ratón es un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina. En diversas realizaciones, los segmentos génicos V_L y J_L de inmunoglobulina endógenos son segmentos génicos V_k y J_k . En diversas realizaciones, los segmentos génicos V_L y J_L de inmunoglobulina endógenos son segmentos génicos V_λ y J_λ .

En una realización, el ratón comprende además una región intergénica V_k - J_k humana de un locus de cadena ligera κ humano, en donde la región intergénica V_k - J_k humana es contigua con el o los segmentos génicos V_λ y J_λ humanos. En una realización específica, la región intergénica V_k - J_k humana se sitúa entre un segmento génico V_λ humano y un segmento génico J_λ humano.

Se describen células y/o tejidos procedentes de ratones como se describe en el presente documento, en donde las células y/o tejidos comprenden (a) una inserción de uno o más segmentos génicos V_λ y J_λ humanos cadena arriba de una región constante de cadena ligera de inmunoglobulina no humana, (b) una inserción de uno o más segmentos génicos V_H humanos, uno o más D_H humanos y uno o más J_H humanos cadena arriba de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina no humana, y (c) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAM6 o un fragmento funcional de la misma. Las regiones constantes de cadena pesada y/o ligera no humanas pueden ser regiones constantes de ratón. Las regiones constantes de cadena pesada y/o ligera no humanas pueden ser regiones constantes de rata. Las regiones constantes de cadena pesada y/o ligera no humanas pueden ser regiones constantes de hámster.

En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAM6 o fragmento funcional de la misma es ectópica en la célula y/o tejido. En una realización la célula y/o tejido de ratón procede de un ratón y la secuencia de nucleótidos codifica una proteína ADAM6 de ratón o fragmento funcional de la misma y está presente en una localización ectópica. En el ratón la célula y/o tejido procede de un ratón y la secuencia de nucleótidos codifica una proteína ADAM6 de ratón o fragmento funcional de la misma y está presente en segmentos génicos de inmunoglobulina. Los segmentos génicos de inmunoglobulina son segmentos génicos de cadena pesada.

Se describe el uso de un ratón como se describe en el presente documento para realizar una proteína de unión a antígeno, en donde el ratón expresa (a) un anticuerpo que comprende (i) una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio V_λ humano y una región constante de cadena ligera κ de ratón y (ii) una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende un dominio V_H humano y una región constante no humana; y (b) una proteína ADAM6 o fragmento funcional de la misma. La proteína de unión a antígeno puede ser humana. Las regiones constantes no humanas son regiones constantes de roedor.

En un aspecto, se proporciona una célula o tejido de ratón procedente de un ratón como se describe en el presente documento. En una realización, la célula o tejido de ratón comprende uno o más segmentos génicos V_λ de inmunoglobulina humana y al menos un segmento génico J_λ de inmunoglobulina humana contiguo con un gen de región constante de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón y uno o más segmentos génicos V_H humanos, uno o más D_H humanos y uno o más J_H humanos contiguos con un gen de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina no humana, en donde la célula o tejido expresa una proteína ADAM6 o un fragmento funcional de la misma. En una realización, el gen de región constante de cadena ligera no humana es un C_k de ratón o C_λ de ratón.

En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína ADAM6 o fragmento funcional de la misma es ectópica. En diversas realizaciones, la célula de ratón es un linfocito B de ratón. En diversas realizaciones, la célula no humana es una célula madre embrionaria.

En una realización, el tejido procede de bazo, médula ósea o ganglio linfático del ratón.

En un aspecto, se proporciona uso de una célula o tejido procedente de un ratón como se describe en el presente documento para realizar un hibridoma o cuadroma.

En un aspecto, se proporciona una célula de ratón que comprende un genoma modificado como se describe en el presente documento, en donde la célula de ratón es un oocito, un embrión hospedador o una fusión de una célula de un ratón como se describe en el presente documento y una célula de un ratón diferente.

5 En un aspecto, se proporciona uso de una célula o tejido procedente de un ratón como se describe en el presente documento para realizar un anticuerpo completamente humano. En una realización, el anticuerpo completamente humano comprende un dominio V_H humano y un dominio V_L humano aislado de un animal no humano como se describe en el presente documento.

10 En un aspecto, se proporciona un método para realizar un anticuerpo que se une con un antígeno de interés, en donde el método comprende (a) exponer un ratón como se describe en el presente documento a un antígeno de interés, (b) aislar uno o más linfocitos B del ratón, en donde el o los linfocitos B expresan un anticuerpo que se une con el antígeno de interés y (c) identificar una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina del anticuerpo que se une con ese antígeno de interés, en donde la cadena ligera de inmunoglobulina comprende un dominio V_L humano y un dominio constante de cadena ligera no humano y (d) emplear la secuencia de ácido nucleico de (c) con una secuencia de ácido nucleico de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina humana para realizar un anticuerpo humano que se une con el antígeno de interés.

20 En una realización, el dominio constante de cadena ligera no humano es un C_k de ratón. En una realización, el dominio constante de cadena ligera no humano es un C_λ de ratón.

En un aspecto, se proporciona un ratón macho fértil que comprende una modificación en un locus de cadena pesada de inmunoglobulina, en donde el ratón macho fértil comprende una secuencia de ADAM6 ectópica que es funcional en el ratón macho.

25

ADAM6 ectópico en ratones de cadena pesada humanizada

Los avances en la dirección génica, por ejemplo, el desarrollo de cromosomas artificiales bacterianos (BAC), permiten ahora la recombinación de fragmentos genómicos relativamente grandes. La modificación por ingeniería genética mediante BAC ha permitido la capacidad de realizar grandes supresiones, y grandes inserciones, en células ES de ratón.

30

Han estado disponibles durante algún tiempo ratones que realizan anticuerpos humanos. Aunque representan un avance importante en el desarrollo de anticuerpos terapéuticos humanos, estos ratones presentan varias anomalías significativas que limitan su utilidad. Por ejemplo, presentan desarrollo de linfocitos B afectado. El desarrollo afectado puede deberse a una diversidad de diferencias entre los ratones transgénicos y ratones de tipo silvestre.

35

Los anticuerpos humanos podrían no interaccionar de forma óptima con receptores de linfocitos B o pre linfocitos B de ratón en la superficie de células de ratón que señalizan maduración, proliferación o supervivencia durante la selección clonal. Los anticuerpos completamente humanos podrían no interaccionar de forma óptima con un sistema de receptor de Fc de ratón; los ratones expresan receptores de Fc que no presentan una correspondencia uno a uno con receptores de Fc humanos. Finalmente, diversos ratones que realizan anticuerpos completamente humanos no incluyen todas las secuencias de ratón genuinas, por ejemplo, elementos potenciadores cadena abajo y otros elementos de control de locus, que pueden ser necesarios para desarrollo de linfocitos B de tipo silvestre.

45

Los ratones que realizan anticuerpos completamente humanos comprenden en general loci de inmunoglobulina endógenos que están inactivados de alguna manera, y se introducen transgenes humanos que comprenden segmentos génicos de inmunoglobulina variables y constantes en una localización aleatoria en el genoma de ratón. Siempre que el locus endógeno esté lo suficientemente inactivado para que no reordene segmentos génicos para formar un gen de inmunoglobulina funcional, el objetivo de la realización de anticuerpos completamente humanos en dicho ratón puede conseguirse, aunque con desarrollo de linfocitos B afectado.

50

Aunque se impulse la realización de anticuerpos completamente humanos a partir del locus del transgén humano, la generación de anticuerpos humanos en un ratón es aparentemente un proceso desfavorecido. En algunos ratones, el proceso está tan desfavorecido que se produce la formación de cadenas pesadas quiméricas variables humanas/constantes de ratón (pero no cadenas ligeras) mediante el mecanismo de cambio en *trans*. Por este mecanismo, los transcritos que codifican anticuerpos completamente humanos experimentan cambio de isotipo en *trans* desde el isotipo humano a un isotipo de ratón. El proceso es en *trans* porque el transgén completamente humano se localiza separado de locus endógeno que conserva una copia sin dañar de un gen de región constante de cadena pesada de ratón. Aunque en dichos ratones el cambio en *trans* es fácilmente evidente el fenómeno aún es insuficiente para rescatar el desarrollo de linfocitos B, que sigue estando bastante alterado. En cualquier caso, los anticuerpos con cambio en *trans* realizados en dichos ratones conservan cadenas ligeras completamente humanas, ya que el fenómeno de cambio en *trans* aparentemente no se produce con respecto a cadenas ligeras; el cambio en *trans* se basa supuestamente en secuencias de cambio en loci endógenos usados (aunque de forma diferente) en cambios de isotipo normal en *cis*. Por lo tanto, incluso cuando los ratones modificados por ingeniería genética para realizar anticuerpos completamente humanos seleccionan un mecanismo de cambio en *trans* para realizar anticuerpos con

60

65

regiones constantes de ratón, la estrategia aún es insuficiente para rescatar el desarrollo de linfocitos B normal.

Una preocupación principal en la realización de productos terapéuticos humanos basados en anticuerpos es realizar una diversidad suficientemente grande de secuencias de región variable de inmunoglobulina humana para identificar dominios variables útiles que reconocen específicamente epítopos particulares y unirlos con una afinidad deseable, habitualmente, pero no siempre, con alta afinidad. Antes del desarrollo de ratones VELOCIMMUNE® (descritos en el presente documento), no hubo ninguna indicación de que los ratones que expresan regiones variables humanas con regiones constantes de ratón muestren ninguna diferencia significativa con respecto a ratones que realizan anticuerpos humanos a partir de un transgén. Esa suposición, sin embargo, fue incorrecta.

Los ratones VELOCIMMUNE®, que contienen un reemplazo preciso de regiones variables de inmunoglobulina de ratón con regiones variables de inmunoglobulina humana en los loci de ratón endógenos, presentan una similitud sorprendente y notable con ratones de tipo silvestre con respecto al desarrollo de linfocitos B. En un acontecimiento sorprendente y asombroso, los ratones VELOCIMMUNE® presentaron una respuesta de tipo silvestre, esencialmente normal, a la inmunización que difirió solamente en un aspecto significativo de los ratones de tipo silvestre, las regiones variables generadas en respuesta a inmunización son completamente humanas.

Los ratones VELOCIMMUNE® contienen un reemplazo a gran escala, preciso, de regiones variables de línea germinal de cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) y cadena ligera de inmunoglobulina (por ejemplo, cadena ligera κ , Ig κ) de ratón con regiones variables de inmunoglobulina humanas, en los loci endógenos. En total, aproximadamente seis megabases de loci de ratón se reemplazan con aproximadamente 1,5 megabases de secuencia genómica humana. Este reemplazo preciso da como resultado un ratón con loci de inmunoglobulina híbridos que realizan cadenas pesadas y ligeras que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. El reemplazo preciso de segmentos V_H - D_H - J_H y V_K - J_K de ratón deja secuencias de ratón flanqueantes intactas y funcionales en los loci de inmunoglobulina híbridos. El sistema inmunitario humoral del ratón actúa como el de un ratón de tipo silvestre. El desarrollo de linfocitos B no se ve impedido en ninguna medida significativa y se genera una rica diversidad de regiones variables humanas en el ratón tras la exposición a antígeno.

Los ratones VELOCIMMUNE® son posibles debido a que los segmentos génicos de inmunoglobulina para cadenas pesadas y ligeras κ se reordenan de forma similar en seres humanos y ratones, lo que no significa que sus loci sean iguales o incluso cercanos, claramente no lo son. Sin embargo, los loci son suficientemente similares para que la humanización del locus de gen variable de cadena pesada pueda conseguirse reemplazando aproximadamente tres millones de pares de bases de secuencia de ratón contigua que contiene todos los segmentos génicos V_H , D_H y J_H con aproximadamente un millón de bases de secuencia genómica humana contigua que abarca básicamente la secuencia equivalente de un locus de inmunoglobulina humana.

En algunas realizaciones, el reemplazo adicional de determinadas secuencias de genes de región constante de ratón con secuencias de genes humanos (por ejemplo, reemplazo de secuencia de C_H1 de ratón con secuencia de C_H1 humana, y reemplazo de secuencia de C_L de ratón con secuencia de C_L humana) da como resultado ratones con loci de inmunoglobulina híbrida que realizan anticuerpos que tienen regiones variables humanas y regiones constantes parcialmente humanas, adecuados para, por ejemplo, realizar fragmentos de anticuerpo completamente humanos, por ejemplo, Fab completamente humanos. Los ratones con loci de inmunoglobulina híbrida muestran reordenación de segmentos génicos variables normal, hipermutación somática normal y cambio de clase normal. Estos ratones muestran un sistema inmunitario humoral que es indistinguible de ratones de tipo silvestre, y presentan poblaciones de células normales en todos los estadios de desarrollo de linfocitos B y estructuras de órganos linfoides normales, incluso cuando los ratones carecen de un repertorio completo de segmentos génicos de región variable humana. La inmunización de estos ratones da como resultado respuestas humorales robustas que presentan una amplia diversidad de uso de segmentos génicos variables.

El reemplazo preciso de segmentos génicos de región variable de línea germinal de ratón permite preparar ratones que tienen loci de inmunoglobulina parcialmente humana. Debido a que los loci de inmunoglobulina parcialmente humana se reordenan, hipermutan y cambian de clase de forma normal, los loci de inmunoglobulina parcialmente humana generan anticuerpos en un ratón que comprende regiones variables humanas. Las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones variables pueden identificarse y clonarse, después fusionarse (por ejemplo, en un sistema *in vitro*) con cualquier secuencia elegida, por ejemplo, cualquier isotipo de inmunoglobulina adecuado para un uso particular, que da como resultado un anticuerpo o proteína de unión a antígeno procedente completamente de secuencias humanas.

Se usó humanización a gran escala mediante métodos de ingeniería por recombinación para modificar células madre embrionarias (ES) de ratón para reemplazar con precisión hasta tres megabases del locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón que incluían esencialmente todos los segmentos génicos V_H , D_H y J_H de ratón con segmentos génicos humanos equivalentes con una secuencia genómica humana de hasta una megabase que contenía algunos o esencialmente todos los segmentos génicos V_H , D_H y J_H humanos. Se usó un segmento de hasta media megabase del genoma humano que comprendía una de dos repeticiones que codificaban esencialmente todos los segmentos génicos V_k y J_k humanos para reemplazar un segmento de tres megabases del locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón que contenía esencialmente todos los segmentos génicos V_K y J_K de ratón.

Los ratones con dichos loci de inmunoglobulina reemplazados pueden comprender una alteración o supresión del locus de ADAM6 de ratón endógeno, que normalmente se encuentra entre el segmento génico V_H más 3' y el segmento génico D_H más 5' en el locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón. La alteración de esta región puede conducir a reducción o eliminación de la funcionalidad del locus de ADAM6 de ratón endógeno. Si los segmentos génicos V_H más 3' del repertorio de cadena pesada humana se usan en un reemplazo, una región intergénica que contiene un pseudogén que parece ser un pseudogén de ADAM6 humano está presente entre estos segmentos génicos V_H, es decir, entre V_H1-2 y V_H1-6 humanos. Sin embargo, los ratones macho que comprenden esta secuencia intergénica humana muestran una reducción de la fertilidad.

Se describen ratones que comprenden los loci reemplazados como se ha descrito anteriormente, y que también comprenden una secuencia de ácido nucleico ectópica que codifica un ADAM6 de ratón, donde los ratones muestran esencialmente fertilidad normal. La secuencia de ácido nucleico ectópica puede comprender una secuencia de ADAM6a de ratón y/o una ADAM6b de ratón o fragmentos funcionales de la misma situados entre un segmento génico V_H1-2 humano y un segmento génico V_H6-1 humano en un locus de cadena pesada endógeno modificado. La secuencia de ácido nucleico ectópica puede ser SEQ ID NO: 3, situada entre V_H1-2 y V_H1-6 humanos en el locus de cadena pesada endógeno modificado. La dirección de transcripción de los genes de ADAM6 de la SEQ ID NO: 3 son opuestas con respecto a la dirección de transcripción de los segmentos génicos V_H humanos circundantes. Aunque los ejemplos del presente documento muestran el rescate de fertilidad colocando la secuencia ectópica entre los segmentos génicos V_H humanos indicados, los expertos en la materia reconocerán que se esperará que la ubicación de la secuencia ectópica en cualquier locus transcripcionalmente permisivo adecuado en el genoma de ratón (o incluso extracromosómicamente) rescate de forma similar la fertilidad en un ratón macho.

El fenómeno de complementar a un ratón que carece de un locus de ADAM6 funcional con una secuencia ectópica que comprende un gen de ADAM6 de ratón u ortólogo u homólogo o fragmento funcional del mismo es un método general que es aplicable al rescate de cualquier ratón con loci de ADAM6 endógenos no funcionales o mínimamente funcionales. Por tanto, una gran cantidad de ratones que comprenden una modificación de alteración de ADAM6 del locus de cadena pesada de inmunoglobulina pueden rescatarse con las composiciones y métodos de la invención. En consecuencia, la invención comprende ratones con una amplia diversidad de modificaciones de loci de cadena pesada de inmunoglobulina que afectan a la función de ADAM6 endógena. En la presente descripción se proporcionan algunos ejemplos (no limitantes). Además de los ratones VELOCIMMUNE® descritos, las composiciones y métodos relacionados con ADAM6 pueden usarse en una gran cantidad de aplicaciones, por ejemplo, cuando se modifica un locus de cadena pesada de una gran diversidad de maneras.

Se describe un ratón que comprende una secuencia de ADAM6 ectópica que codifica una proteína ADAM6 funcional (u ortólogo u homólogo o fragmento funcional de la misma), un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón con uno o más segmentos génicos V_H humanos, un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos D_H de ratón y segmentos génicos J_H con segmentos génicos D_H humanos y J_H humanos; en donde el ratón carece de una región C_H1 y/o bisagra. En una realización, el ratón realiza una única proteína de unión de dominio variable que es un dímero de cadenas de inmunoglobulina seleccionadas de: (a) V_H humana - C_H1 de ratón - C_H2 de ratón - C_H3 de ratón; (b) V_H humana - bisagra de ratón - C_H2 de ratón - C_H3 de ratón; y (c) V_H humana - C_H2 de ratón - C_H3 de ratón.

En un aspecto, la secuencia de nucleótidos que rescata la fertilidad se sitúa en una secuencia de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana (por ejemplo, entre los segmentos génicos V_H1-2 y V_H1-6 humanos) en un ratón que tiene un reemplazo de uno o más segmentos génicos variables de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón (mV_H, mD_H y/o mJ_H) con uno o más segmentos génicos variables de cadena pesada de inmunoglobulina humana (hV_H, hD_H y/o hJ_H) y el ratón comprende además un reemplazo de uno o más segmentos génicos variables de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón (mV_K y/o mJ_K) con uno o más segmentos génicos variables de cadena ligera κ de inmunoglobulina humana (hV_K y/o hJ_K). En una realización, la secuencia de nucleótidos se sitúa entre un segmento génico V_H1-2 humano y un segmento génico V_H1-6 humano en un ratón VELOCIMMUNE® (documentos US 6.596.541 y US 7.105.348). En una realización, el ratón VELOCIMMUNE® modificado de este modo comprende un reemplazo con todos o sustancialmente todos los segmentos génicos variables de cadena pesada de inmunoglobulina humana (todos los hV_H, hD_H y hJ_H) y todos o sustancialmente todos los segmentos génicos variables de cadena ligera κ de inmunoglobulina humana (hV_K y hJ_K).

En una realización, el o los segmentos génicos variables de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón comprenden aproximadamente tres megabases del locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón. En una realización, el o los segmentos génicos variables de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón comprenden al menos 89 segmentos génicos V_H, al menos 13 segmentos génicos D_H, al menos cuatro segmentos génicos J_H o una combinación de los mismos del locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón. En una realización, el uno o los segmentos génicos variables de cadena pesada de inmunoglobulina humana comprenden aproximadamente una megabase de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina humana. En una realización, el o los segmentos génicos variables de cadena pesada de inmunoglobulina humana comprenden al menos 80 segmentos génicos V_H, al menos 27 segmentos génicos D_H, al menos seis segmentos génicos J_H o una combinación de los mismos de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina humana.

En una realización, el o los segmentos génicos variables de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón comprenden aproximadamente tres megabases del locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón. En una realización, el o los segmentos génicos variables de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón comprenden al menos 137 segmentos génicos V_{κ} , al menos cinco segmentos génicos J_{κ} o una combinación de los mismos del locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón. En una realización, el o los segmentos génicos variables de cadena ligera κ de inmunoglobulina humana comprenden aproximadamente media megabase de un locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina humana. En una realización específica, el o los segmentos génicos variables de cadena ligera κ de inmunoglobulina humana comprenden la repetición próxima (con respecto a la región constante κ de inmunoglobulina) de un locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina humana. En una realización, el o los segmentos génicos variables de cadena ligera κ de inmunoglobulina humana comprenden al menos 40 segmentos génicos V_{κ} , al menos cinco segmentos génicos J_{κ} o una combinación de los mismos de un locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina humana.

La secuencia de nucleótidos se sitúa entre dos segmentos génicos de inmunoglobulina humana que son segmentos génicos de cadena pesada humana.

Se describe un locus de ADAM6 de ratón funcional (u ortólogo u homólogo o fragmento funcional del mismo) presente en el medio de segmentos génicos de ratón que están presentes en el locus de región variable de cadena pesada de ratón endógeno, siendo dicho locus incapaz de reordenarse para codificar una cadena pesada funcional que contiene una región constante de cadena pesada endógena. El locus de cadena pesada de ratón endógeno puede comprender al menos uno y hasta 89 segmentos génicos V_H , al menos uno y hasta 13 segmentos génicos D_H , al menos uno y hasta cuatro segmentos génicos J_H y una combinación de los mismos. Un locus de ADAM6 de ratón funcional (u ortólogo u homólogo o fragmento funcional del mismo) puede codificar una o más proteínas ADAM6 que son funcionales en el ratón, en donde la o las proteínas ADAM6 comprenden SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o una combinación de las mismas.

En un aspecto, un locus de ADAM6 de ratón funcional (u ortólogo u homólogo o fragmento funcional del mismo) está presente en el medio de segmentos génicos V_H humanos que reemplazan segmentos génicos V_H de ratón endógenos. En una realización, al menos 89 segmentos génicos V_H de ratón se retiran y reemplazan con uno o más segmentos génicos V_H humanos y el locus de ADAM6 de ratón está presente inmediatamente adyacente al extremo 3' de los segmentos génicos V_H humanos, o entre dos segmentos génicos V_H humanos. En una realización específica, el locus de ADAM6 de ratón está presente entre dos segmentos génicos V_H a una distancia de aproximadamente 20 kilobases (kb) a aproximadamente 40 kilobases (kb) del extremo 3' de los segmentos génicos V_H humanos insertados. En una realización específica, el locus de ADAM6 de ratón está presente entre dos segmentos génicos V_H a una distancia de aproximadamente 29 kb a aproximadamente 31 kb del extremo 3' de los segmentos génicos V_H humanos insertados. En una realización específica, el locus ADAM6 de ratón está presente a una distancia de aproximadamente 30 kb del extremo 3' de los segmentos génicos V_H humanos insertados. En una realización específica, el locus de ADAM6 de ratón está presente a una distancia de aproximadamente 30.184 pb del extremo 3' de los segmentos génicos V_H humanos insertados. En una realización específica, el reemplazo incluye segmentos génicos V_H humanos V_{H1-2} y V_{H6-1} , y el locus de ADAM6 de ratón está presente cadena abajo del segmento génico V_{H1-2} y cadena arriba del segmento génico V_{H6-1} . En una realización específica, el locus de ADAM6 de ratón está presente entre un segmento génico V_{H1-2} humano y un segmento génico V_{H6-1} humano, en donde el extremo 5' del locus de ADAM6 de ratón está a aproximadamente 13.848 pb del extremo 3' del segmento génico V_{H1-2} y el extremo 3' del locus de ADAM6 está aproximadamente 29.737 pb 5' del segmento génico V_{H6-1} humano. En una realización específica, el locus de ADAM6 de ratón comprende la SEQ ID NO: 3 o un fragmento de la misma que confiere función de ADAM6 en células del ratón. En una realización específica, la disposición de segmentos génicos V_H humanos es por lo tanto la siguiente (de cadena arriba a cadena abajo con respecto a la dirección de transcripción de los segmentos génicos V_H humanos): V_{H1-2} humano – locus de ADAM6 de ratón - V_{H6-1} humano. En una realización específica, el pseudogén de ADAM6 entre V_{H1-2} humano y V_{H6-1} humano se reemplaza con el locus de ADAM6 de ratón. En una realización, la orientación de uno o más de ADAM6a de ratón y ADAM6b de ratón del locus de ADAM6 de ratón es opuesta con respecto a la dirección de la transcripción en comparación con la orientación de los segmentos génicos V_H humanos. Como alternativa, el locus de ADAM6 de ratón está presente en la región intergénica entre el segmento génico V_H humano más 3' y el segmento génico D_H más 5'. Esto puede suceder tanto si el segmento D_H más 5' es de ratón como si es humano.

De forma similar, un ratón modificado con uno o más segmentos génicos V_L humanos (por ejemplo, segmentos V_{κ} o V_{λ}) que reemplazan todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón endógenos puede modificarse para mantener el locus de ADAM6 de ratón endógeno, como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, empleando un vector de dirección que tiene una rama de homología cadena abajo que incluye un locus de ADAM6 de ratón o fragmento funcional del mismo, o para reemplazar un locus de ADAM6 de ratón dañado con una secuencia ectópica situada entre dos segmentos génicos V_L humanos o entre los segmentos génicos V_L humanos y un segmento génico D_H o un segmento génico J . El reemplazo incluye dos o más segmentos génicos V_L humanos, y el locus de ADAM6 de ratón o fragmento funcional del mismo está presente entre los dos segmentos génicos V_L más 3'. La reordenación de segmentos génicos V_L humanos puede entonces ser la siguiente (de cadena arriba a cadena abajo con respecto a la dirección de transcripción de los segmentos génicos humanos): $V_{L3'-1}$ humano - locus de ADAM6 de ratón - $V_{L3'}$ humano. La orientación de uno o más de ADAM6a de ratón y ADAM6b de ratón del locus de ADAM6 de ratón puede

ser opuesta con respecto a la dirección de transcripción en comparación con la orientación de los segmentos génicos V_L humanos. Como alternativa, el locus de ADAM6 de ratón está presente en la región intergénica entre el segmento génico V_L humano más 3' y el segmento génico D_H más 5'. Esto puede suceder tanto si el segmento D_H más 5' es de ratón como si es humano.

5 Se describe un ratón con un reemplazo de uno o más segmentos génicos V_H de ratón endógenos, y que comprende al menos un segmento génico D_H de ratón endógeno. En dicho ratón, la modificación de los segmentos génicos V_H de ratón endógenos puede comprender una modificación de uno o más de los segmentos génicos V_H más 3', pero no el
10 segmento génico D_H más 5', donde se tiene cuidado de que la modificación del o los segmentos génicos V_H más 3' no altere o haga al locus de ADAM6 de ratón endógeno no funcional. Por ejemplo, el ratón puede comprender un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón endógenos con uno o más segmentos génicos V_H humanos, y el ratón comprende uno o más segmentos génicos D_H endógenos y un locus de ADAM6 de ratón endógeno funcional.

15 [Eliminado]

El empleo de ratones que contienen una secuencia ectópica que codifica una proteína ADAM6 de ratón o un ortólogo u homólogo u homólogo funcional de la misma es útil cuando las modificaciones alteran la función de ADAM6 de ratón endógeno. La probabilidad de alterar la función de ADAM6 de ratón endógeno es alta cuando se realizan
20 modificaciones en loci de inmunoglobulina de ratón, en particular cuando se modifican regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón y secuencias circundantes. Por tanto, dichos ratones proporcionan un beneficio particular cuando se preparan ratones con loci de cadena pesada de inmunoglobulina que están suprimidos completamente o en parte, están humanizados completamente o en parte o están reemplazados (por ejemplo, con secuencias V_k o V_λ) completamente o en parte. Los expertos en la materia conocen métodos para realizar las
25 modificaciones genéticas descritas para los ratones descritos posteriormente.

Los ratones que contienen una secuencia ectópica que codifica una proteína ADAM6 de ratón, o una proteína sustancialmente idéntica o similar que confiere los beneficios de fertilidad de una proteína ADAM6 de ratón, son particularmente útiles junto con modificaciones de un locus de gen variable de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón que alteran o suprimen la secuencia de ADAM6 de ratón endógena. Aunque se describen principalmente en
30 relación con ratones que expresan anticuerpos con regiones variables humanas y regiones constantes de ratón, dichos ratones son útiles en relación con cualquier modificación genética que altere los genes de ADAM6 de ratón endógenos. Los expertos en la materia reconocerán que esto abarca una amplia diversidad de ratones modificados genéticamente que contienen modificaciones de loci de genes variables de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón. Estos incluyen, por ejemplo, ratones con una supresión o un reemplazo de todos o parte de segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina, independientemente de otras modificaciones.

Se describen ratones modificados genéticamente que comprenden un gen de ADAM6 ectópico de ratón, roedor u otro (u ortólogo u homólogo o fragmento) funcional en un ratón, y uno o más segmentos génicos de región variable y/o
40 constante de inmunoglobulina humana. Otros ortólogos u homólogos o fragmentos del gen de ADAM6 funcionales en un ratón pueden incluir secuencias de bóvidos, cánidos, primates, conejos u otras secuencias no humanas.

Se desvela un ratón que comprende una secuencia de ADAM6 ectópica que codifica una proteína ADAM6 funcional, un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón con uno o más segmentos génicos
45 V_H humanos; un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos D_H de ratón con uno o más segmentos génicos D_H humanos; y un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos J_H de ratón con uno o más segmentos génicos J_H humanos.

En una realización, el ratón comprende además un reemplazo de una secuencia de nucleótidos C_H1 de ratón con una secuencia de nucleótidos C_H1 humana. En una realización, el ratón comprende además un reemplazo de una
50 secuencia de nucleótidos de bisagra de ratón con una secuencia de nucleótidos de bisagra humana. En una realización, el ratón comprende además un reemplazo de un locus variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L y J_L) con un locus variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana. En una realización, el ratón comprende además un reemplazo de una secuencia de nucleótidos de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón con una secuencia de nucleótidos de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina humana. En una
55 realización específica, los V_L , J_L y C_L son secuencias de cadena ligera κ de inmunoglobulina. En una realización específica, el ratón comprende una secuencia de región constante de inmunoglobulina C_H2 de ratón y C_H3 de ratón fusionada con una secuencia de bisagra humana y una C_H1 humana, de modo que los loci de inmunoglobulina de ratón se reordenan para formar un gen que codifica una proteína de unión que comprende (a) una cadena pesada que tiene una región variable humana, una región C_H1 humana, una región bisagra humana y una región C_H2 de ratón y una C_H3 de ratón; y (b) un gen que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio variable humano y una región constante humana.

En un aspecto, el ratón proporcionado comprende una secuencia de ADAM6 ectópica que codifica una proteína ADAM6 funcional, un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón con uno o más
65 segmentos génicos V_L humanos, y opcionalmente un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos

génicos D_H y/o segmentos génicos J_H con uno o más segmentos génicos D_H humanos y/o segmentos génicos J_H humanos, u opcionalmente un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos D_H y segmentos génicos J_H con uno o más segmentos génicos J_L humanos.

- 5 El ratón puede comprender un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H , D_H y J_H de ratón con uno o más segmentos génicos V_L , uno o más D_H y uno o más J (por ejemplo, J_k o J_λ), en donde los segmentos génicos están unidos operativamente con una región bisagra de ratón endógena, en donde el ratón forma un gen de cadena de inmunoglobulina reordenado que contiene, de 5' a 3' en la dirección de la transcripción, V_L humano - D_H humano o de ratón - J humano o de ratón - bisagra de ratón - C_H2 de ratón - C_H3 de ratón. En una realización, la región J es una región J_k humana. La región J puede ser una región J_H humana. La región J es una región J_λ humana. La región V_L humana puede seleccionarse de una región V_λ humana y una región V_k humana.

- 10 El ratón puede expresar un único anticuerpo de dominio variable que tiene una región constante de ratón o humana y una región variable procedente de una V_k humana, una D_H humana y una J_k humana; una V_k humana, una D_H humana y una J_H humana; una V_λ humana, una D_H humana y una J_λ humana; una V_λ humana, una D_H humana y una J_H humana; una V_k humana, una D_H humana y una J_λ humana; una V_λ humana, una D_H humana y una J_k humana. Las secuencias de reconocimiento de recombinación pueden modificarse para permitir que se produzcan reordenamientos productivos entre los segmentos génicos V , D y J enumerados o entre los segmentos génicos V y J enumerados.

- 20 Se describe un ratón que comprende una secuencia de ADAM6 ectópica que codifica una proteína ADAM6 funcional (u ortólogo u homólogo o fragmento funcional de la misma), un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón con uno o más segmentos génicos V_L humanos, un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos D_H y segmentos génicos J_H de ratón con segmentos génicos J_L humanos; en donde el ratón carece de una región C_H1 y/o bisagra.

- 25 En una realización, el ratón carece de una secuencia que codifica un dominio C_H1 . En una realización, el ratón carece de una secuencia que codifica una región bisagra. En una realización, el ratón carece de una secuencia que codifica un dominio C_H1 y una región bisagra.

- 30 En una realización específica, el ratón expresa una proteína de unión que comprende un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana (λ o κ) fusionado con un dominio C_H2 de ratón que está unido con un dominio C_H3 de ratón.

- 35 Se describe un ratón que comprende una secuencia de ADAM6 ectópica que codifica una proteína ADAM6 funcional (u ortólogo u homólogo o fragmento funcional de la misma), un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón con uno o más segmentos génicos V_L humanos, un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos D_H y J_H de ratón con segmentos génicos J_L humanos.

- 40 En una realización, el ratón comprende una supresión de una secuencia génica de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina que codifica una región C_H1 , una región bisagra, una región C_H1 y una bisagra o una región C_H1 y una región bisagra y una región C_H2 .

- 45 En una realización, el ratón realiza una única proteína de unión a dominio variable que comprende un homodímero seleccionado de los siguientes: (a) V_L humano - C_H1 de ratón - C_H2 de ratón - C_H3 de ratón; (b) V_L humano - bisagra de ratón - C_H2 de ratón - C_H3 de ratón; (c) V_L humano - C_H2 de ratón - C_H3 de ratón.

- 50 Se describe un ratón con un locus de inmunoglobulina de cadena pesada endógeno inactivado, que comprende un locus de ADAM6 de ratón endógeno inactivado o suprimido, en donde el ratón comprende una secuencia de ácido nucleico que expresa un anticuerpo humano o de ratón o quimérico humano/de ratón u otro.

- 55 En una realización, el ratón comprende además un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno inactivado. En una realización específica, el locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno se selecciona de un locus de cadena ligera kappa (κ) y una lambda (λ). En una realización específica, el ratón comprende un locus de cadena ligera κ endógeno inactivado y un locus de cadena ligera λ inactivado, en donde el ratón expresa un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana y un dominio de cadena ligera de inmunoglobulina humana. En una realización, el dominio de cadena ligera de inmunoglobulina humana se selecciona de un dominio de cadena ligera κ humano y un dominio de cadena ligera λ humano. En una realización específica, el ratón comprende un locus de cadena ligera κ endógeno inactivado, en donde el ratón expresa un anticuerpo que comprende una cadena pesada de inmunoglobulina humana/de ratón (es decir, variable humana/constante de ratón) y una cadena ligera de inmunoglobulina humana/de ratón que comprende un dominio V_λ humano. En una realización, la cadena ligera de inmunoglobulina humana/de ratón comprende un C_k de ratón. En una realización, la cadena ligera de inmunoglobulina humana/de ratón comprende un C_λ de ratón. En una realización específica, el C_λ de ratón es un $C_{\lambda 2}$.

- 65 Se describe un animal modificado genéticamente que expresa un anticuerpo quimérico y expresa una proteína ADAM6 u ortólogo u homólogo de la misma que es funcional en el animal modificado genéticamente.

El animal modificado genéticamente es un ratón. En una realización, el animal modificado genéticamente es un ratón, y la proteína ADAM6 u ortólogo u homólogo de la misma es de una cepa de ratón que es una cepa diferente del animal modificado genéticamente.

Un anticuerpo quimérico puede comprender un dominio variable humano y una secuencia de región constante de un roedor. El roedor puede seleccionarse de un roedor de la familia Cricetidae y un roedor de la familia Muridae. El roedor de la familia Cricetidae y de la familia Muridae puede ser un ratón. El roedor de la familia Cricetidae y de la familia Muridae puede ser una rata. El anticuerpo quimérico puede comprender un dominio variable humano y un dominio constante de un animal seleccionado de un ratón o una rata; el ratón o la rata pueden seleccionarse de la familia Cricetidae y la familia Muridae. El anticuerpo quimérico puede comprender un dominio variable de cadena pesada humano, un dominio variable de cadena ligera humano y una secuencia de región constante procedente de un roedor seleccionado de ratón y rata, en donde el dominio variable de cadena pesada humano y la cadena ligera humana son afines. Los afines incluyen que los dominios variables de cadena pesada humana y cadena ligera humana son de un único linfocito B que expresa el dominio variable de cadena ligera humano y el dominio variable de cadena pesada humano juntos y presentan los dominios variables juntos en la superficie de un linfocito B individual.

El anticuerpo quimérico puede expresarse a partir de un locus de inmunoglobulina. El dominio variable de cadena pesada del anticuerpo quimérico se expresa a partir de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno reordenado. El dominio variable de cadena ligera del anticuerpo quimérico puede expresarse a partir de un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno reordenado.

[Eliminado]

Se describe un ratón, que comprende un locus de cadena pesada de inmunoglobulina humanizado, en donde el locus de cadena pesada de inmunoglobulina humanizado comprende una secuencia de ADAM6 no humana u ortólogo u homólogo de la misma.

El animal no humano puede ser un roedor seleccionado de un ratón, una rata y un hámster.

El ortólogo u homólogo de ADAM6 no humano puede ser una secuencia que es ortóloga y/u homóloga de una secuencia de ADAM6 de ratón, en donde el ortólogo u homólogo es funcional en el ratón.

En una realización específica, el ortólogo u homólogo de ADAM6 es de un animal que se selecciona de una especie de ratón diferente, una rata y un hámster.

En una realización específica, la secuencia de ADAM6 es de un animal seleccionado de un roedor de la superfamilia Dipodoidea y un roedor de la superfamilia Muroidea. En una realización específica, el ratón es de la superfamilia Muroidea, y el ortólogo u homólogo de ADAM6 es de un ratón o una rata o un hámster de la superfamilia Muroidea.

El locus de cadena pesada humanizado comprende uno o más segmentos génicos V_H humanos, uno o más segmentos génicos D_H humanos y uno o más segmentos génicos J_H humanos. En una realización específica, el o los segmentos génicos V_H humanos, uno o más segmentos génicos D_H humanos y uno o más segmentos génicos J_H humanos están unidos operativamente con uno o más genes de región constante humanos, quiméricos y/o de roedor (por ejemplo, ratón o rata). En una realización, los genes de región constante son ratón. En una realización, los genes de región constante son de rata. En una realización, los genes de región constante son de hámster. En una realización, los genes de región constante comprenden una secuencia seleccionada de una bisagra, una C_H2 , una C_H3 y una combinación de las mismas. En una realización específica, los genes de región constante comprenden una secuencia de bisagra, una C_H2 y una C_H3 .

En una realización, la secuencia de ADAM6 no humana es contigua con una secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina humana. La secuencia de ADAM6 no humana se sitúa en una secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina humana. La secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina humana comprende un segmento génico V, D y J.

En una realización, la secuencia de ADAM6 no humana está yuxtapuesta con un segmento génico V. En una realización, la secuencia de ADAM6 no humana se sitúa entre dos segmentos génicos V. En una realización, la secuencia de ADAM6 no humana está yuxtapuesta entre un segmento génico V y D. En una realización, la secuencia de ADAM6 de ratón está situada entre un segmento génico V y uno J. En una realización, la secuencia de ADAM6 de ratón está yuxtapuesta entre un segmento génico D y uno J.

Se describe un animal no humano modificado genéticamente, que comprende un linfocito B que expresa un dominio V_H humano afín con un dominio V_L humano de un locus de inmunoglobulina, en donde el animal no humano expresa una proteína no humana distinta de inmunoglobulina a partir del locus de inmunoglobulina.

[Eliminado]

La proteína no humana distinta de inmunoglobulina puede ser una proteína de roedor, por ejemplo de la familia Muridae.

5 [Eliminado]

[Eliminado]

[Eliminado]

10 La secuencia de inmunoglobulina humana comprende uno o más segmentos génicos V_H , uno o más segmentos génicos D_H y uno o más segmentos génicos J_H .

15 En una realización, la secuencia de inmunoglobulina comprende uno o más segmentos génicos V_H que tienen una alta frecuencia en repertorios humanos naturales. En una realización específica, el o los segmentos génicos V_H comprenden no más de dos segmentos génicos V_H , no más de tres segmentos génicos V_H , no más de cuatro segmentos génicos V_H , no más de cinco segmentos génicos V_H , no más de seis segmentos génicos V_H , no más de siete segmentos génicos V_H , no más de ocho segmentos génicos V_H , no más de nueve segmentos génicos V_H , no más de 10 segmentos génicos V_H , no más de 11 segmentos génicos V_H , no más de 12 segmentos génicos V_H , no más de 13 segmentos génicos V_H , no más de 14 segmentos génicos V_H , no más de 15 segmentos génicos V_H , no más de 16 segmentos génicos V_H , no más de 17 segmentos génicos V_H , no más de 18 segmentos génicos V_H , no más de 19 segmentos génicos V_H , no más de 20 segmentos génicos V_H , no más de 21 segmentos génicos V_H , no más de 22 segmentos génicos V_H o no más de 23 segmentos génicos V_H .

25 En una realización específica, el o los segmentos génicos V_H comprenden cinco segmentos génicos V_H . En una realización específica, el o los segmentos génicos V_H comprenden 10 segmentos génicos V_H . En una realización específica, el o los segmentos génicos V_H comprenden 15 segmentos génicos V_H . En una realización específica, el o los segmentos génicos V_H comprenden 20 segmentos génicos V_H .

30 En diversas realizaciones, los segmentos génicos V_H se seleccionan de V_H6-1 , V_H1-2 , V_H1-3 , V_H2-5 , V_H3-7 , V_H1-8 , V_H3-9 , V_H3-11 , V_H3-13 , V_H3-15 , V_H3-16 , V_H1-18 , V_H3-20 , V_H3-21 , V_H3-23 , V_H1-24 , V_H2-26 , V_H4-28 , V_H3-30 , V_H4-31 , V_H3-33 , V_H4-34 , V_H3-35 , V_H3-38 , V_H4-39 , V_H3-43 , V_H1-45 , V_H1-46 , V_H3-48 , V_H3-49 , V_H5-51 , V_H3-53 , V_H1-58 , V_H4-59 , V_H4-61 , V_H3-64 , V_H3-66 , V_H1-69 , V_H2-70 , V_H3-72 , V_H3-73 y V_H3-74 . En diversas realizaciones, los segmentos génicos V_H se seleccionan de V_H1-2 , V_H1-8 , V_H1-18 , V_H1-46 , V_H1-69 , V_H3-7 , V_H3-9 , V_H3-11 , V_H3-13 , V_H3-15 , V_H3-21 , V_H3-23 , V_H3-30 , V_H3-33 , V_H3-43 , V_H3-48 , V_H4-31 , V_H4-34 , V_H4-39 , V_H4-59 , V_H5-51 y V_H6-1 . En diversas realizaciones, los segmentos génicos V_H se seleccionan de V_H1-18 , V_H1-46 , V_H1-69 , V_H3-7 , V_H3-11 , V_H3-15 , V_H3-21 , V_H3-23 , V_H3-30 , V_H3-33 , V_H3-48 , V_H4-34 , V_H4-39 , V_H4-59 y V_H5-51 . En diversas realizaciones, los segmentos génicos V_H se seleccionan de V_H1-18 , V_H3-11 , V_H3-21 , V_H3-23 , V_H3-30 , V_H4-39 y V_H4-59 . En diversas realizaciones, los segmentos génicos V_H se seleccionan de V_H1-18 , V_H3-21 , V_H3-23 , V_H3-30 y V_H4-39 . En diversas realizaciones, los segmentos génicos V_H se seleccionan de V_H1-18 , V_H3-23 y V_H4-39 . En diversas realizaciones, los segmentos génicos V_H se seleccionan de V_H3-21 , V_H3-23 y V_H3-30 . En diversas realizaciones, los segmentos génicos V_H se seleccionan de V_H3-23 , V_H3-30 y V_H4-39 .

45 En una realización específica, la secuencia de inmunoglobulina humana comprende al menos 18 segmentos génicos V_H , 27 segmentos génicos D_H y seis segmentos génicos J_H . En una realización específica, la secuencia de inmunoglobulina humana comprende al menos 39 segmentos génicos V_H , 27 segmentos génicos D_H y seis segmentos génicos J_H . En una realización específica, la secuencia de inmunoglobulina humana comprende al menos 80 segmentos génicos V_H , 27 segmentos génicos D_H y seis segmentos génicos J_H .

50 En una realización, el ratón comprende un reemplazo de segmentos génicos V_H de ratón endógenos con uno o más segmentos génicos V_H humanos, en donde los segmentos génicos V_H humanos están unidos operativamente con un gen de región C_H de ratón, de modo que el ratón reordena los segmentos génicos V_H humanos y expresa una cadena pesada de inmunoglobulina quimérica inversa que comprende un dominio V_H humano y un C_H de ratón. En una realización, 90-100 % de los segmentos génicos V_H de ratón no reordenados se reemplazan con al menos un segmento génico V_H humano no reordenado. En una realización específica, todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón endógenos se reemplazan con al menos un segmento génico V_H humano no reordenado. En una realización, el reemplazo es con al menos 19, al menos 39 o al menos 80 u 81 segmentos génicos V_H humanos no reordenados. En una realización, el reemplazo es con al menos 12 segmentos génicos V_H humanos no reordenados funcionales, al menos 25 segmentos génicos V_H humanos no reordenados funcionales, o al menos 43 segmentos génicos V_H humanos no reordenados funcionales. En una realización, el ratón comprende un reemplazo de todos los segmentos génicos D_H y J_H de ratón con al menos un segmento D_H humano no reordenado y al menos un segmento J_H humano no reordenado. En una realización, el al menos un segmento D_H humano no reordenado se selecciona de 1-1, 1-7, 1-26, 2-8, 2-15, 3-3, 3-10, 3-16, 3-22, 5-5, 5-12, 6-6, 6-13, 7-27 y una combinación de los mismos. En una realización, el al menos un segmento J_H humano no reordenado se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, y una combinación de los mismos. En una realización específica, el o los segmentos génicos V_H humanos se seleccionan

de un segmento génico V_H humano 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51 y 6-1, y una combinación de los mismos.

En diversas realizaciones, la secuencia de inmunoglobulina humana está en una unión operativa con una región constante en la línea germinal del ratón. En una realización, la región constante es una región constante humana, quimérica humana/de ratón o quimérica humana/de rata o quimérica humana/de hámster, de ratón, de rata o de hámster. En una realización, la región constante es una región constante de roedor (por ejemplo, ratón o rata o hámster). En una realización específica, el roedor es un ratón o una rata. En diversas realizaciones, la región constante comprende al menos un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3}.

La secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina humana se localiza en un locus de cadena pesada de inmunoglobulina en la línea germinal del ratón.

El ratón comprende además una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende una o más secuencias V y J de cadena ligera no reordenadas en la línea germinal del ratón. La secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina es una secuencia de cadena ligera λ de inmunoglobulina. La secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende uno o más segmentos génicos V λ y uno o más segmentos génicos J λ .

En una realización específica, la secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende al menos 12 segmentos génicos V λ y un segmento génico J λ . En una realización específica, la secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende al menos 12 segmentos génicos V λ y cuatro segmentos génicos J λ .

En una realización específica, la secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende al menos 28 segmentos génicos V λ y un segmento génico J λ . En una realización específica, la secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende al menos 28 segmentos génicos V λ y cuatro segmentos génicos J λ .

En una realización específica, la secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende al menos 40 segmentos génicos V λ y un segmento génico J λ . En una realización específica, la secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende al menos 40 segmentos génicos V λ y cuatro segmentos génicos J λ .

La secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina humana está en unión operativa con una región constante en la línea germinal del animal no humano (por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón o rata o hámster). La región constante es una región constante κ de ratón (mC κ).

La secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina humana está localizada en un locus de cadena ligera de inmunoglobulina en la línea germinal del ratón. El locus de cadena ligera de inmunoglobulina en la línea germinal del ratón es un locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina.

Se describe un método para realizar un anticuerpo humano, en donde el anticuerpo humano comprende dominios variables procedentes de una o más secuencias de ácido nucleico de región variable codificadas en una célula de un animal no humano como se describe en el presente documento.

Se describe una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido que comprende anticuerpo o fragmento de anticuerpo que procede de una o más secuencias de ácido nucleico de región variable aisladas de un ratón como se describe en el presente documento. El polipéptido puede ser un anticuerpo. El polipéptido puede ser un anticuerpo solamente de cadena pesada. El polipéptido puede ser un fragmento variable monocatenario (por ejemplo, un scFv).

En un aspecto, se proporciona uso de un ratón como se describe en el presente documento para realizar un anticuerpo. En diversas realizaciones, el anticuerpo comprende uno o más dominios variables que proceden de una o más secuencias de ácido nucleico de región variable aisladas del ratón. En una realización específica, la secuencia de ácido nucleico de región variable comprende segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina. En una realización específica, las secuencias de ácido nucleico de región variable comprenden segmentos génicos de cadena ligera de inmunoglobulina.

Ratones que expresan dominios variables λ humanos

Pueden criarse ratones modificados genéticamente que comprenden una modificación que reduce la fertilidad debido a pérdida de una actividad de proteína ADAM (por ejemplo, dependiente de ADAM6) con ratones como se describe en el presente documento que comprenden secuencias variables λ humanas en genes ligeros constantes de ratón endógenos. Por ejemplo, se combinan ratones que comprenden un gen de ADAM6 dañado (o un gen de ADAM6 suprimido), por ejemplo animales con loci de cadena pesada de inmunoglobulina humanizados, con ratones que comprenden un locus de cadena ligera (endógeno o transgénico) que comprende segmentos λ humanos y segmentos J λ ligados a genes de región constante de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón, en donde los animales no humanos comprenden una actividad que restaura la fertilidad dependiente de ADAM. La modificación genética que restaura la fertilidad dependiente de ADAM puede ser en un ratón con una cadena pesada humanizada o en un ratón con segmentos variables λ humanizados. La descendencia comprende genes que forman una cadena pesada

humanizada (es decir, dan como resultado expresión de un dominio variable de cadena pesada humano) y un locus de cadena ligera humanizado (es decir, da como resultado la expresión de un dominio variable de cadena ligera λ humano, fusionado con una región κ de ratón), en donde los animales muestran una fertilidad que está aumentada en comparación con un ratón que carece de la actividad de ADAM6 o actividad de un ortólogo u homólogo de ADAM6.

Los ratones modificados por ingeniería genética VELOCIMMUNE® comprenden un reemplazo de segmentos génicos V(D)J no reordenados en loci de ratón endógenos con segmentos génicos V(D)J humanos. Los ratones VELOCIMMUNE® expresan anticuerpos quiméricos que tienen dominios variables humanos y dominios constantes de ratón (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos n.º 7.605.237). La mayoría de los otros informes se refieren a ratones que expresan anticuerpos completamente humanos a partir de transgenes completamente humanos en ratones que tienen loci de inmunoglobulina endógenos inactivados.

Las cadenas ligeras de anticuerpos están codificadas por uno de dos loci separados: kappa (κ) y lambda (λ). Las cadenas ligeras de anticuerpo de ratón son principalmente del tipo κ . Los ratones que realizan anticuerpos de ratón, y ratones modificados que realizan anticuerpos completamente humanos o quiméricos humanos-de ratón, presentan un sesgo en el uso de cadena ligera. Los seres humanos también muestran sesgo de cadena ligera, pero no tan pronunciado como en ratones; la relación de cadenas ligeras κ con respecto a cadenas ligeras λ en ratones es de aproximadamente 95:5, mientras que en seres humanos la relación es de aproximadamente 60:40. No se cree que el sesgo más pronunciado en ratones afecte gravemente a la diversidad de anticuerpos, debido a que en ratones el locus variable λ no es tan diverso en primer lugar. Esto no es así en seres humanos. El locus de cadena ligera λ humano es muy diverso.

El locus de cadena ligera λ humano se extiende durante 1.000 kb y contiene más de 80 genes que codifican segmentos variables (V) o de unión (J) (FIGURA 19). Dentro del locus de cadena ligera λ humano, más de la mitad de todos los dominios $V\lambda$ observados están codificados por los segmentos génicos 1-40, 1-44, 2-8, 2-14 y 3-21. En general, se cree que aproximadamente 30 de los segmentos génicos $V\lambda$ humanos son funcionales. Hay siete segmentos génicos $J\lambda$, solamente cuatro de los cuales se consideran en general segmentos génicos $J\lambda$ funcionales $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$ y $J\lambda 7$.

El locus de cadena ligera λ en seres humanos es similar en su estructura al locus λ tanto de ratones como de seres humanos porque el locus de cadena ligera λ humano tiene varios segmentos génicos de región variable que son capaces de recombinar para formar una proteína de cadena ligera funcional. El locus de cadena ligera λ humano contiene aproximadamente 70 segmentos génicos V y 7 pares de segmentos génicos $J\lambda$ - $C\lambda$. Solamente cuatro de estos pares de segmentos génicos $J\lambda$ - $C\lambda$ parecen ser funcionales. En algunos alelos, se ha indicado que un quinto par de segmentos génicos $J\lambda$ - $C\lambda$ es un pseudogén ($C\lambda 6$). Los 70 segmentos génicos $V\lambda$ parecen contener 38 segmentos génicos funcionales. Las 70 secuencias de $V\lambda$ se disponen en tres grupos, todos los cuales contienen miembros diferentes de grupos de familias de genes V distintos (grupos A, B y C; FIGURA 19). Esta es una fuente potencialmente rica de diversidad relativamente desaprovechada para generar anticuerpos con regiones V humanas en animales no humanos.

En claro contraste, el locus de cadena ligera λ de ratón contiene solamente dos o tres (dependiendo de la cepa) segmentos génicos de región $V\lambda$ de ratón (FIGURA 20). Al menos por esta razón, no se cree que el gran sesgo hacia κ en ratones sea particularmente perjudicial para la diversidad de anticuerpos total.

Según mapas publicados del locus de cadena ligera λ de ratón, el locus consiste esencialmente en dos grupos de segmentos génicos en una longitud de aproximadamente 200 kb (FIGURA 20). Los dos grupos contienen dos conjuntos de genes de V, J y C que tienen capacidad de reordenamiento independiente: $V\lambda 2$ - $J\lambda 2$ - $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ y $V\lambda 1$ - $J\lambda 3$ - $C\lambda 3$ - $J\lambda 1$ - $C\lambda 1$. Aunque se ha descubierto que $V\lambda 2$ se recombina con todos los segmentos génicos $J\lambda$, $V\lambda 1$ parece recombinarse exclusivamente con $C\lambda 1$. Se cree que $C\lambda 4$ es un pseudogén con sitio de corte y empalme defectuosos.

El locus de cadena ligera κ de ratón es sorprendentemente diferente. La estructura y número de segmentos génicos que participan en los acontecimientos de recombinación que conducen a una proteína de cadena ligera funcional del locus κ de ratón es mucho más complejo (FIGURA 21). Por tanto, las cadenas ligeras λ de ratón no contribuyen en gran medida a la diversidad de una población de anticuerpos en un ratón típico.

El aprovechamiento de la rica diversidad del locus de cadena ligera λ humano en ratones probablemente daría como resultado, entre otras cosas, una fuente para un repertorio humano más completo de dominios V de cadena ligera. Los intentos previos de aprovechar esta diversidad han usado transgenes humanos que contienen trozos del locus de cadena ligera λ humano incorporados aleatoriamente en el genoma de ratón (véase, por ejemplo, documentos US 6.998.514 y US 7.435.871). Se ha indicado que los ratones que contienen estos transgenes integrados de forma aleatoria expresan cadenas ligeras λ completamente humanas, sin embargo, en algunos casos, uno o ambos loci de cadena ligera endógenos permanecen intactos. Esta situación no es deseable ya que las secuencias de cadena ligera λ humana compiten con la cadena ligera de ratón (κ o λ) en el repertorio de anticuerpos expresados del ratón.

Por el contrario, los inventores describen ratones modificados genéticamente que son capaces de expresar una o más secuencias de ácido nucleico de cadena ligera λ directamente a partir de un locus de cadena ligera κ de ratón, incluyendo por reemplazo en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno. Pueden criarse adicionalmente ratones

modificados genéticamente capaces de expresar secuencias de cadena ligera λ humana a partir de un locus endógeno con ratones que comprenden un locus de cadena pesada humano y por lo tanto usarse para expresar anticuerpos que comprenden regiones V (pesada y ligera) que son completamente humanas. En diversas realizaciones, las regiones V se expresan con regiones constantes de ratón. En diversas realizaciones, no está presente ningún segmento génico de inmunoglobulina de ratón endógeno y las regiones V se expresan con regiones constantes humanas. Estos anticuerpos resultarían ser útiles en numerosas aplicaciones, tanto de diagnóstico como terapéuticas.

Pueden obtenerse muchas ventajas para diversas realizaciones de expresión de proteínas de unión procedentes de segmentos génicos $V\lambda$ y $J\lambda$ humanos en ratones. Pueden obtenerse ventajas colocando secuencias λ humanas en un locus de cadena ligera endógeno, por ejemplo, el locus κ o λ de ratón. Los anticuerpos realizados a partir de dichos ratones pueden tener cadenas ligeras que comprenden dominios $V\lambda$ humanos fusionados con una región C_L de ratón, específicamente una región $C\kappa$ o $C\lambda$ de ratón. Los ratones también expresarán dominios $V\lambda$ humanos que son adecuados para la identificación y clonación para su uso con regiones C_L humanas, específicamente regiones $C\kappa$ y/o $C\lambda$. Debido a que el desarrollo de linfocitos B en dichos ratones es por lo demás normal, es posible generar dominios $V\lambda$ compatibles (incluyendo dominios $V\lambda$ mutados de forma somática) en el contexto de regiones $C\lambda$ o $C\kappa$.

Se describen ratones modificados genéticamente que comprenden un segmento génico $V\lambda$ no reordenado en un locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina. Se describen ratones que expresan anticuerpos que comprenden una cadena ligera que tiene un dominio $V\lambda$ humano fusionado con una región $C\kappa$ de ratón.

Se describe un ratón modificado genéticamente que comprende (1) uno o más segmentos génicos $V\lambda$ humanos no reordenados y uno o más segmentos génicos $J\lambda$ humanos no reordenados en un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno del animal no humano, (2) uno o más segmentos génicos V_H humanos, uno o más segmentos génicos D_H humanos y uno o más segmentos génicos J_H humanos en un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno del animal no humano, en donde el ratón es capaz de expresar una proteína ADAM6 o fragmento funcional de la misma, en donde la proteína ADAM6 es funcional en un macho del animal no humano. Se describe un ratón modificado genéticamente que expresa anticuerpos que contienen cadenas pesadas que comprenden dominios V_H humanos y regiones constantes de cadena pesada y cadenas ligeras no humanas que comprenden dominios $V\lambda$ humanos y regiones constantes de cadena ligera kappa de ratón, en donde los ratones son capaces de expresar una proteína ADAM6 o fragmento funcional de la misma.

En una realización, la proteína ADAM6 o fragmento funcional de la misma está codificada por una secuencia ectópica en la línea germinal del ratón. En una realización, la proteína ADAM6 o fragmento funcional de la misma está codificada por una secuencia endógena del ratón.

El locus de cadena ligera endógeno del ratón es un locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina.

En una realización, el ratón carece de un segmento génico V_L y/o J_L endógeno en el locus de cadena ligera endógeno. En una realización específica, el segmento génico V_L y/o J_L son un segmento génico $V\kappa$ y/o $J\kappa$. En una realización específica, los segmentos génicos V_L y/o J_L son un segmento génico $V\lambda$ y/o $J\lambda$.

En una realización específica, los segmentos génicos V_L y J_L del ratón se reemplazan por uno o más segmentos génicos $V\lambda$ humanos y uno o más segmentos génicos $J\lambda$ humanos. En una realización específica, los segmentos génicos V_L y J_L del ratón son segmentos génicos κ . En una realización específica, los segmentos génicos V_L y J_L del ratón son segmentos génicos λ .

En una realización, el o los segmentos génicos $V\lambda$ humanos son de un fragmento del grupo A del locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana. En una realización específica, el fragmento del grupo A se extiende desde $V\lambda 3$ -27 humano hasta $V\lambda 3$ -1 humano. En una realización específica, el fragmento del grupo A se extiende desde $V\lambda 3$ -12 humano hasta $J\lambda 1$ humano. En una realización, el o los segmentos génicos $V\lambda$ humanos son de un fragmento del grupo B del locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana. En una realización específica, el fragmento del grupo B se extiende desde $V\lambda 5$ -52 humano hasta $V\lambda 1$ -40 humano. En una realización específica, el o los segmentos génicos $V\lambda$ humanos son de un fragmento del grupo A y de un fragmento del grupo B del locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana como se describe en el presente documento.

En una realización, el ratón comprende al menos 12 segmentos génicos $V\lambda$ humanos. En una realización, el ratón comprende al menos 28 segmentos génicos $V\lambda$ humanos. En una realización, el ratón comprende al menos 40 segmentos génicos $V\lambda$ humanos.

En una realización, el al menos un segmento génico $J\lambda$ humano se selecciona del grupo que consiste en $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$, $J\lambda 7$ y una combinación de los mismos.

Se describe un ratón fértil, en donde el animal no humano fértil expresa (1) una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio $V\lambda$ humano o un dominio $V\kappa$ humano, y (2) una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende un dominio V_H humano, en donde el ratón macho comprende un locus de región variable de cadena pesada modificado y un gen de ADAM6 ectópico que es funcional en el ratón macho.

En un aspecto, se proporciona uso de un ratón como se describe en el presente documento para realizar una proteína de unión a antígeno. En una realización, la proteína de unión a antígeno es humana. En una realización, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo. En una realización, la proteína de unión a antígeno comprende un dominio V_H humano y/o un dominio V_λ humano procedente de un ratón como se describe en el presente documento.

En un aspecto, se proporciona una célula o un tejido procedente de un ratón como se describe en el presente documento. En una realización, el tejido procede de un bazo, médula ósea o un ganglio linfático. En una realización, la célula es un linfocito B. En una realización, la célula es una célula madre embrionaria (ES). En una realización, la célula es una célula germinal.

También se describe un oocito que comprende un genoma diploide de un ratón modificado genéticamente como se describe en el presente documento.

Transcritos estériles del locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina

Las variaciones del tema de expresión de secuencias λ de inmunoglobulina humana en ratones se reflejan en diversas realizaciones de ratones modificados genéticamente capaces de dicha expresión. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los ratones modificados genéticamente comprenden determinadas secuencia o secuencias no codificantes de un locus humano. En una realización, el ratón modificado genéticamente comprende segmentos V_λ y J_λ humanos en un locus de cadena ligera κ endógeno, y comprende además un fragmento genómico de cadena ligera κ humano. En una realización específica, el fragmento genómico de cadena ligera κ humano es una secuencia no codificante hallada de forma natural entre un segmento génico V_κ humano y un segmento génico J_κ humano.

Los loci de cadena ligera κ humana y de ratón contienen secuencias que codifican transcritos estériles que carecen de un codón de inicio o una fase abierta de lectura, y que se consideran elementos que regulan la transcripción de los loci de cadena ligera κ. Estos transcritos estériles surgen de una secuencia intergénica localizada cadena abajo o 3' del segmento génico V_κ más próximo y cadena arriba o 5' del potenciador intrónico de cadena ligera κ (Eκi) que está cadena arriba del gen de región constante de cadena ligera κ (Cκ). Los transcritos estériles surgen del reordenamiento de la secuencia intergénica para formar un segmento V_κJ_κ1 fusionado con un Cκ.

Un reemplazo del locus de cadena ligera κ cadena arriba del gen de Cκ retiraría la región intergénica que codifica los transcritos estériles. Por lo tanto, en diversas realizaciones, un reemplazo de secuencia de cadena ligera κ de ratón cadena arriba del gen de Cκ de ratón con segmentos génicos de cadena ligera λ humana daría como resultado un locus de cadena ligera κ de ratón humanizado que contiene segmentos génicos V_λ y J_λ humanos pero no la región intergénica de cadena ligera κ que codifica los transcritos estériles.

Como se describe en el presente documento, la humanización del locus de cadena ligera κ de ratón endógeno con segmentos génicos de cadena ligera λ humana, en donde la humanización retira la región intergénica, da como resultado una reducción sorprendente en el uso del locus de cadena ligera κ, junto con un aumento notable del uso de cadena ligera λ. Por lo tanto, aunque un ratón humanizado que carece de la región intergénica es útil porque puede realizar anticuerpos con dominios variables de cadena ligera humana (por ejemplo, dominios λ o κ humanos), el uso del locus se reduce.

También se describe la humanización del locus de cadena ligera κ de ratón endógeno con segmentos génicos V_λ y J_λ humanos junto con una inserción de una región intergénica κ humana para crear un locus V_λ que contiene, con respecto a la transcripción, entre el segmento génico V_λ humano final y el primer segmento génico J_λ humano, una región intergénica κ; que muestra una población de linfocitos B con una mayor expresión que un locus que carece de la región intergénica κ. Esta observación es coherente con una hipótesis de que la región intergénica directamente a través de un transcrito estéril, o indirectamente suprime el uso del locus de cadena ligera λ endógeno. Según dicha hipótesis, la inclusión de la región intergénica daría como resultado una reducción del uso del locus de cadena ligera λ endógeno, permitiendo al ratón solamente una elección restringida de emplear el locus modificado (λ en κ) para generar anticuerpos.

En diversas realizaciones, un reemplazo de la secuencia de cadena ligera κ de ratón cadena arriba del gen de Cκ de ratón con secuencia de cadena ligera λ humana comprende además una región intergénica de cadena ligera κ humana dispuesta, con respecto a la transcripción, entre la región no traducida 3' del segmento génico V_λ más 3' y 5' del primer segmento génico J_λ humano. Como alternativa, dicha región intergénica puede omitirse de un locus de cadena ligera κ endógeno reemplazado (cadena arriba del gen de Cκ de ratón) realizando una supresión en el locus de cadena ligera λ endógeno. De forma similar, según esta realización, el ratón genera anticuerpos a partir de un locus de cadena ligera κ endógeno que contiene secuencias de cadena ligera λ humanas.

Enfoques para la modificación por ingeniería genética de ratones para expresar dominios V_λ humanos

Se describen diversos enfoques para preparar ratones modificados genéticamente que realizan anticuerpos que

contienen una cadena ligera que tiene un dominio V λ humano fusionado con una región C κ endógena. Se describen modificaciones genéticas que, en diversas realizaciones, comprenden una supresión de uno o ambos loci de cadena ligera endógenos. Por ejemplo, para eliminar cadenas ligeras λ de ratón del repertorio de anticuerpos endógenos puede realizarse una supresión de un primer grupo de genes V λ -J λ -C λ y reemplazo, completamente o en parte, de los segmentos génicos V λ -J λ de un segundo grupo de genes con segmentos génicos V λ -J λ humanos. También se proporcionan embriones, células de ratones modificados genéticamente y construcciones de dirección para preparar los ratones, embriones de ratón y células.

La supresión de un grupo de genes V λ -J λ -C λ endógeno y reemplazo de los segmentos génicos V λ -J λ de otro grupo de genes V λ -J λ -C λ endógeno emplea una alteración relativamente mínima de la asociación de región constante de anticuerpo natural y función en el animal, en diversas realizaciones, debido a que los genes de C λ endógenos permanecen intactos y por lo tanto conservan la funcionalidad normal y la capacidad para asociarse con la región constante de una cadena pesada endógena. Por tanto, en dichas realizaciones la modificación no afecta a otras regiones constantes de cadena pesada endógenas dependientes de regiones constantes de cadena ligera funcionales para el ensamblaje de una molécula de anticuerpo funcional que contiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Además, en diversas realizaciones la modificación no afecta al ensamblaje de una molécula de anticuerpo unida a membrana funcional que implica una cadena pesada endógena y una cadena ligera, por ejemplo, un dominio hV λ unido a una región C λ de ratón. Debido a que se conserva al menos un gen de C λ funcional en el locus endógeno, los animales que contienen un reemplazo de los segmentos génicos V λ -J λ de un grupo de genes V λ -J λ -C λ endógeno con segmentos génicos V λ -J λ humanos deberían ser capaces de realizar cadenas ligeras λ normales que son capaces de unirse con el antígeno durante una respuesta inmunitaria a través de los segmentos génicos V λ -J λ humanos presentes en el repertorio de anticuerpos expresados del animal.

Se proporciona una ilustración esquemática (no a escala) de un grupo de genes V λ -J λ -C λ de ratón endógeno suprimido en la FIGURA 20. Como se ilustra, el locus de cadena ligera λ de ratón se organiza en dos grupos de genes, ambos de los cuales contienen segmentos génicos de función capaces de recombinarse para formar una cadena ligera λ de ratón de función. El grupo de genes V λ 1-J λ 3-C λ 3-J λ 1-C λ 1 de ratón endógeno se suprime mediante una construcción de dirección (Vector de Dirección 1) con un casete de neomicina flanqueado por sitios de recombinación. El otro grupo de genes endógeno (V λ 2-V λ 3-J λ 2-C λ 2-J λ 4-C λ 4) se suprime en parte por una construcción de dirección (Vector de Dirección 2) con un casete de higromicina-timidina quinasa flanqueado por sitios de recombinación. En este segundo acontecimiento de dirección, los segmentos génicos endógenos C λ 2-J λ 4-C λ 4 se conservan. La segunda construcción de dirección (Vector de Dirección 2) se construye usando sitios de recombinación que son diferentes de los de la primera construcción de dirección (Vector de Dirección 1), permitiendo de este modo la supresión selectiva del casete de selección después de haberse conseguido una dirección con éxito. El locus de doble diana resultante se silencia funcionalmente porque no puede producirse ninguna cadena ligera λ endógena. Este locus modificado puede usarse para la inserción de segmentos génicos V λ y J λ humanos para crear un locus λ de ratón endógeno que comprende segmentos génicos V λ y J λ humanos, por lo que, tras la recombinación en el locus modificado, el animal produce cadenas ligeras λ que comprenden segmentos génicos V λ y J λ humanos reordenados ligados a un segmento génico C λ de ratón endógeno.

La modificación genética de un ratón para hacer segmentos génicos λ endógenos no funcionales, en diversas realizaciones, da como resultado un ratón que muestra exclusivamente cadenas ligeras κ en su repertorio de anticuerpos, haciendo al ratón útil para evaluar el papel de las cadenas ligeras λ en la respuesta inmunitaria, y útil para realizar un repertorio de anticuerpos que comprende dominios V κ pero no dominios V λ .

Un ratón modificado genéticamente que expresa un hV λ ligado a un gen de C λ de ratón que se ha recombinado en el locus de cadena ligera λ de ratón endógeno puede prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica. Se proporciona una ilustración esquemática (no a escala) del reemplazo de los segmentos génicos V λ 2-V λ 3-J λ 2 de ratón endógenos con segmentos génicos V λ y J λ humanos en la FIGURA 22A. Como se ilustra, un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno que se ha hecho no funcional se reemplaza por una construcción de dirección (Vector de Dirección 12/1- λ) que incluye un casete de neomicina flanqueado por sitios de recombinación. Los segmentos génicos V λ 2-V λ 3-J λ 2 se reemplazan con un fragmento genómico que contiene secuencia λ humana que incluye 12 segmentos génicos hV λ y un único segmento génico hJ λ .

Por tanto, este primer enfoque sitúa uno o más segmentos génicos hV λ en el locus de cadena ligera λ endógeno contiguo con un único segmento génico hJ λ (FIGURA 22A).

Pueden realizarse modificaciones adicionales del locus de cadena ligera λ endógeno modificado usando técnicas similares para insertar más segmentos génicos hV λ . Por ejemplo, se proporcionan ilustraciones esquemáticas de dos construcciones de dirección adicionales (Vectores de Dirección +16- λ y +12- λ) usados para inserción progresiva de segmentos génicos hV λ humanos de adición en la FIGURA 23A. Como se ilustra, se insertan fragmentos genómicos adicionales que contienen segmentos génicos hV λ humanos específicos en el locus de cadena ligera λ endógeno modificado en etapas sucesivas usando homología proporcionada por la inserción previa de secuencias de cadena ligera λ humanas. Tras la recombinación con cada construcción de dirección ilustrada, de manera secuencial, se insertan 28 segmentos génicos hV λ adicionales en el locus de cadena ligera λ endógeno modificado. Esto crea un locus quimérico que produce una proteína de cadena ligera λ que comprende segmentos génicos V λ -J λ ligados a un

gen de C λ de ratón.

Los enfoques anteriores para insertar segmentos génicos de cadena ligera λ humanos en el locus λ de ratón mantienen los potenciadores situados cadena abajo de los segmentos génicos C λ 2-J λ 4-C λ 4 (designados Enh 2.4, Enh y Enh 3.1, FIGURA 22A y FIGURA 23A). Este enfoque da como resultado un único alelo modificado en el locus de cadena ligera λ de ratón endógeno (FIGURA 25A).

Se proporcionan composiciones y métodos para preparar un ratón que expresa una cadena ligera que comprende segmentos génicos hV λ y J λ unidos operativamente a un segmento génico C λ de ratón, incluyendo composiciones y un método para preparar un ratón que expresa dichos genes a partir de un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno. Los métodos incluyen hacer selectivamente a un grupo de genes V λ -J λ -C λ de ratón endógeno no funcional (por ejemplo, mediante una supresión dirigida) y emplear un segmento génico hV λ y J λ en el locus de cadena ligera λ de ratón endógeno para expresar un dominio hV λ en un ratón.

Como alternativa, en un segundo enfoque, pueden situarse segmentos génicos de cadena ligera λ humana en el locus de cadena ligera κ endógeno. La modificación genética, en diversas realizaciones, comprende una supresión del locus de cadena ligera κ endógeno. Por ejemplo, para eliminar cadenas ligeras κ de ratón del repertorio de anticuerpos endógeno puede realizarse una supresión de los segmentos génicos V κ y J κ de ratón. También se proporcionan embriones de ratón, células y construcciones de dirección modificadas genéticamente para preparar los ratones, embriones de ratón y células.

Por las razones indicadas anteriormente, la supresión de los segmentos génicos V κ y J κ de ratón emplea una alteración relativamente mínima. Se proporciona una ilustración esquemática (no a escala) de segmentos génicos V κ y J κ de ratón suprimidos en la FIGURA 21. Los segmentos génicos V κ y J κ de ratón endógenos se suprimen mediante supresión mediada por recombinasa de secuencias de ratón situadas entre dos vectores de dirección situados con precisión que emplean cada uno sitios de recombinación específica. Se emplea un primer vector de dirección (Vector de Dirección J κ) en un primer acontecimiento de dirección para suprimir los segmentos génicos J κ de ratón. Se emplea un segundo vector de dirección (Vector de Dirección V κ) en un segundo acontecimiento de dirección secuencial para suprimir una secuencia localizada 5' del segmento génico V κ de ratón más distante. Ambos vectores de dirección contienen sitios de recombinación específica permitiendo de este modo la supresión selectiva de ambos casetes de selección y todas las secuencias de cadena ligera κ de ratón intermedias después de haberse conseguido una dirección con éxito. El locus suprimido resultante se silencia funcionalmente de modo que no pueda producirse ninguna cadena ligera κ endógena. Este locus modificado puede usarse para la inserción de segmentos génicos hV λ y J λ para crear un locus κ de ratón endógeno que comprende segmentos génicos hV λ y J λ , por lo que, tras la recombinación en el locus modificado, el animal produce cadenas ligeras λ que comprenden segmentos génicos hV λ y J λ reordenados unidos operativamente con un segmento génico C κ de ratón endógeno. Pueden usarse diversos vectores de dirección que comprenden secuencias de cadena ligera λ humanas junto con este locus κ de ratón suprimido para crear un locus de cadena ligera híbrido que contiene segmentos génicos λ humanos unidos operativamente con una región C κ de ratón.

Por tanto, un segundo enfoque sitúa uno o más segmentos génicos V λ humanos en el locus de cadena ligera κ de ratón contiguo con un único segmento génico J λ humano (Vector de Dirección 12/1- κ , FIGURA 22B).

En diversas realizaciones, pueden realizarse modificaciones de este enfoque para añadir segmentos génicos y/o secuencias reguladoras para optimizar el uso de las secuencias de cadena ligera λ humanas del locus κ de ratón en el repertorio de anticuerpos de ratón.

En un tercer enfoque, se sitúan uno o más segmentos génicos hV λ en el locus de cadena ligera κ de ratón contiguo con cuatro secuencias de genes de hJ λ (Vector de Dirección 12/4- κ , FIGURA 22B).

En un tercer enfoque, se sitúan uno o más segmentos génicos hV λ en el locus de cadena ligera κ de ratón contiguo con una secuencia intergénica κ humana y una única secuencia de gen de hJ λ (Vector de Dirección 12(κ)-1- κ , FIGURA 22B).

En un cuarto enfoque, se sitúan uno o más segmentos génicos hV λ en el locus de cadena ligera κ de ratón contiguo con una secuencia intergénica κ humana y cuatro secuencias de genes de hJ λ (Vector de Dirección 12(κ)-4- κ , FIGURA 22B).

Todos los enfoques anteriores para insertar segmentos génicos de cadena ligera λ humanos en el locus κ de ratón, mantienen el elemento potenciador intrónico κ cadena arriba del gen de C κ (designado E κ i, FIGURA 22B y FIGURA 23B) y el potenciador κ 3' cadena abajo del gen de C κ (designado E κ 3', FIGURA 22B y FIGURA 23B). Los enfoques dan como resultado cuatro alelos modificados separados en el locus de cadena ligera κ de ratón endógeno (FIGURA 25B).

En diversas realizaciones, el ratón modificado genéticamente comprende una desactivación del locus de cadena ligera λ de ratón endógeno. En una realización, el locus de cadena ligera λ es desactivado por una estrategia que suprime

la región que abarca de V λ 2 a J λ 2, y la región que abarca de V λ 1 a C λ 1 (FIGURA 20). Cualquier estrategia que reduzca o elimine la capacidad del locus de cadena ligera λ endógeno para expresar dominios λ endógenos es adecuada para su uso con realizaciones en la presente divulgación.

5 Anticuerpos de dominio lambda de ratones modificados genéticamente

Los ratones que comprenden secuencias λ humanas en el locus de cadena ligera κ o λ de ratón expresarán una cadena ligera que comprende una región hV λ fusionada con una región C λ de ratón (C κ o C λ). Estos se crían provechosamente con ratones que (a) comprenden un locus de cadena ligera silenciado funcionalmente (por ejemplo, una desactivación del locus de cadena ligera κ o λ de ratón endógeno); (b) comprenden un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno que comprende segmentos génicos hV y hJ unidos operativamente con un gen de C λ de ratón endógeno; (c) comprenden un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno que comprende segmentos génicos hV κ y hJ κ unidos operativamente con un gen de C κ de ratón endógeno; y (d) un ratón en el que un alelo κ comprende hV κ y hJ κ ; comprendiendo el otro alelo κ hV λ y hJ λ ; comprendiendo un alelo λ hV λ y hJ λ y un alelo λ silenciado o desactivado, o comprendiendo ambos alelos λ hV λ y hJ λ ; y dos alelos de cadena pesada que comprenden cada uno hV H , hD H y hJ H .

Los anticuerpos que comprenden los dominios hV λ expresados en el contexto de C κ o C λ se usan para realizar anticuerpos completamente humanos clonando los ácidos nucleicos que codifican los dominios hV λ en construcciones de expresión que portan genes que codifican C λ humano. Se transfectan construcciones de expresión resultantes en células hospedadoras adecuadas para expresar anticuerpos que presentan un dominio completamente hV λ fusionado con hC λ .

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir cómo realizar y usar métodos y composiciones de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención. A menos que se indique otra cosa, la temperatura se indica en grados Celsius y la presión es atmosférica o cercana a la atmosférica.

30 Ejemplo 1. Humanización de genes de inmunoglobulina de ratón.

Se usaron cromosomas artificiales bacterianos (BAC) humanos y de ratón para generar por ingeniería genética 13 vectores de dirección BAC diferentes (BACvec) para humanización de los loci de cadena pesada y cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón. Las Tablas 1 y 2 exponen descripciones detalladas de las etapas realizadas para la construcción de todos los BACvec empleados para la humanización de los loci de cadena pesada y cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón, respectivamente.

Identificación de BAC humanos y de ratón. Los BAC de ratón que abarcan los extremos 5' y 3' de los loci de cadena pesada y cadena ligera de κ de inmunoglobulina se identificaron mediante hibridación de filtros a los que se aplica puntualmente biblioteca de BAC o mediante exploración por PCR de grupos de ADN de bibliotecas de BAC de ratón. Los filtros se hibridaron en condiciones convencionales usando sondas que correspondían a las regiones de interés. Los grupos de bibliotecas se exploraron mediante PCR usando pares de cebadores únicos que flanquean la región diana de interés. Se realizó PCR adicional usando los mismos cebadores para desconvolucionar un pocillo dado y aislar el BAC correspondiente de interés. Se generaron tanto filtros de BAC como grupos de bibliotecas a partir de 129 células ES de ratón SvJ (Incyte Genomics/Invitrogen). Se identificaron BAC humanos que abarcan los loci de cadena pesada y cadena ligera κ de inmunoglobulina completos mediante hibridación de filtros a los que se aplica puntualmente biblioteca de BAC (bibliotecas B, C o D de Caltech y biblioteca RPCI-11, Research Genetics/Invitrogen) mediante exploración de grupos de bibliotecas de BAC humanos (biblioteca de Caltech, Invitrogen) mediante un método basado en PCR o usando una base de datos de secuencias de extremos de BAC (biblioteca de Caltech D, TIGR).

Construcción de BACvec mediante recombinación homóloga bacteriana y ligamiento. Se realizó recombinación homóloga bacteriana (BHR) como se ha descrito (Valenzuela *et al.*, 2003; Zhang, Y., Buchholz, F., Muylers, J. P., y Stewart, A.F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet* 20, 123-128). En la mayoría de los casos, se generaron fragmentos lineales ligando cajas de homología procedentes de PCR con casetes clonados seguido de aislamiento en gel de productos de ligamiento y electroporación en bacterias competentes para BHR que albergan el BAC diana. Después de selección en placas de petri con antibióticos apropiados, se identificaron BAC recombinados correctamente mediante PCR a través de ambos puntos de unión novedosos seguido de análisis de restricción en geles con campos pulsados (Schwartz, D. C., y Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75) y comprobando mediante PCR usando cebadores distribuidos entre las secuencias humanas.

Se construyó un BACvec 3hV H usando tres etapas de BHR secuenciales para la etapa inicial de humanización del locus de cadena pesada de inmunoglobulina (FIGURA 4A y Tabla 1). En la primera etapa (Etap 1), se introdujo un casete en un BAC parental humano cadena arriba del segmento génico V H 1-3 humano que contiene una región de homología con el locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón (HB1), un gen que confiere resistencia a kanamicina en bacterias y resistencia a G418 en células animales (kanR) y un sitio de recombinación específica (por

ejemplo, loxP). En la segunda etapa (Etapa 2), se introdujo un segundo casete justo cadena abajo del último segmento J_H que contiene una segunda región de homología con el locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón (HB2) y un gen que confiere resistencia en bacterias a espectinomicina (specR). Esta segunda etapa incluyó suprimir secuencias del locus de cadena pesada de inmunoglobulina humana cadena abajo de J_H6 y el gen de resistencia a cloranfenicol del vector de BAC (cmR). En la tercera etapa (Etapa 3), el BAC humano doblemente modificado (B1) se linealizó después usando sitios I-CeuI que se habían añadido durante las primeras dos etapas y se integró en un BAC de ratón (B2) mediante BHR a través de las dos regiones de homología (HB1 y HB2). Las selecciones farmacológicas para primera (cm/kan), segunda (spec/kan) y tercera (cm/kan) etapas se diseñaron para que fueran específicas para los productos deseados. Se analizaron clones de BAC modificados mediante electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE) después de digestión con enzimas de restricción para determinar la construcción apropiada (FIGURA 4B).

De una manera similar, se fabricaron 12 BACvec adicionales para humanización de los loci de cadena pesada y cadena ligera κ. En algunos casos, se realizó ligamiento de BAC en lugar de BHR para unir dos BAC grandes mediante introducción de sitios de restricción poco habituales en ambos BACvec parentales mediante BHR junto con colocación cuidadosa de marcadores seleccionables. Esto permitió la supervivencia del producto de ligamiento deseado tras selección con combinaciones de marcadores farmacológicos específicos. Los BAC recombinantes obtenidos mediante ligamiento después de digestión con enzimas de restricción poco habituales se identificaron y exploraron de una manera similar a los obtenidos mediante BHR (como se ha descrito anteriormente).

TABLA 1

BACvec	Etapa	Descripción	Proceso
3hV _H	1	Insertar caja de homología de ratón cadena arriba en BAC próximo humano CTD-2572o2	BHR
	2	Insertar caja de homología de ratón cadena abajo en BAC próximo humano CTD-2572o2	BHR
	3	Insertar 3hVH/27hDH/9hJH en BAC próximo de ratón CT7-302a07 para crear 3hVH BACvec	BHR
DC	1	Insertar casete en extremo distante de locus de IgH de ratón usando BAC de ratón CT7-253i20	BHR
18hV _H	1	Insertar marcador de specR en el extremo cadena abajo de inserción de 3hVH usando BAC humano CTD-2572o2	BHR
	2	Insertar sitios I-CeuI y Not que flanquean puroR en el extremo cadena arriba de inserción de 3hVH	BHR
	3	Insertar sitio Not en el extremo cadena abajo de BAC Rel2-408p02 BAC (≈10 kb cadena abajo de VH2-5)	BHR
	4	Insertar sitio I-Ceu1 en el extremo cadena arriba de BAC Rel2-408p02 (≈23 kb cadena arriba de VH1-18)	BHR
	5	Ligar fragmentos de 184 kb de la etapa 4 en vector de 153 kb de la etapa 2	Ligamiento
	6	Recortar la homología humana de BAC CTD-2572o2 suprimiendo ≈85 kb y dejando homología de 65 kb con 3hVH	BHR
	7	Insertar casete y sitio de Not en el extremo distante de locus de IgH de ratón en BAC CT7-253i20	BHR
	8	Subclonar rama de homología distante de ratón para inserción cadena arriba de BAC humanos	Ligamiento
	9	Insertar rama de ratón de 20 kb cadena arriba de Rel2-408p02	BHR
	10	Intercambiar casete de selección de hygR con neoR para crear BACvec 18hVH	BHR
39hV _H	1	Insertar sitios ICEul y PIScl que flanquean hygR en el extremo distante de BAC humano CTD-2534n10	BHR
	2	Insertar CmR en el extremo próximo de BAC CTD-2534n10 para permitir la selección para ligamiento con BAC RP11-72n10	BHR
	3	Insertar sitio PIScl en BAC RP11-72n10 para ligamiento con BAC CTD-2534n10	BHR
	4	Insertar sitios ICEul y AscI que flanquean puroR en el extremo distante de BAC RP11-72n10	BHR
	5	Ligar el fragmento de 161 kb de la construcción de la etapa 4 en la construcción de la etapa 2 reemplazando hygR	Ligamiento

BACvec	Etapas	Descripción	Proceso
	6	Insertar sitio neoR y Ascl en el extremo próximo de rama de homología distante de ratón usando BAC CT7-253i20	BHR
	7	Insertar sitio specR e ICEul en el extremo distante de rama de homología distante de ratón	BHR
	8	Ligar rama de homología distante de ratón en inserto humano de la etapa	Ligamiento
	9	Intercambiar casete de selección de neo a hyg usando UbCp y pA como cajas de homología para crear BACvec 39hVH	BHR
53hV _H	1	Insertar specR en el extremo próximo de BAC CTD-3074b5	BHR
	2	Insertar sitio Ascl en el extremo distante de BAC CTD-3074b5 humano	BHR
	3	Insertar sitio hygR y Ascl en el extremo próximo de rama de homología distante de ratón usando BAC CT7-253i20	BHR
	4	Ligar rama de homología distante de ratón en la construcción de la etapa 2	Ligamiento
	5	Intercambiar casete de selección de hyg a neo usando UbCp y pA como cajas de homología para crear BACvec 53hVHc	BHR
70hV _H	1	Insertar sitios PIScl e ICEul que flanquean spec en el extremo distante de BAC humano CTD-2195p5	BHR
	2	Insertar sitio ICEul en el extremo próximo de BAC RP11-926p12 para ligamiento con BAC CTD-2195p5	BHR
	3	Insertar sitios PIScl y Ascl en el extremo distante de BAC RP11-926p12 para ligamiento de rama de ratón	BHR
	4	Ligar rama de homología distante de ratón en la construcción de la etapa 3	Ligamiento
	5	Ligar rama de homología distante de ratón y fragmento hlgH de BAC RP11-926p12 en BAC CTD-2195p5 para crear BACvec 70hVH	Ligamiento
80hV _H	1	Insertar sitios ICEul y Ascl que flanquean hygR en el extremo distante de BAC CTD-2313e3	BHR
	2	Ligar rama de homología distante de ratón en BAC CTD-2313e3 humano de la etapa 1 para crear BACvec 80hVH	Ligamiento

TABLA 2

BACvec	Etapas	Descripción	Proceso
Igk-PC	1	Insertar sitio loxP en el intrón J-C de ratón usando BAC CT7-254m04	BHR
Igk-DC	1	Insertar sitio loxP en el extremo distante de locus IgK de ratón usando BAC CT7-302g12	BHR
6hVk	1	Insertar sitio PIScel ≈400 pb cadena abajo de hJk5 en BAC CTD-2366j12	BHR
	2	Insertar sitios IScel y AscI que flanquean hygR en extremo distante de BAC CTD-2366j12	BHR
	3	Insertar sitios IScel y PIScel que flanquean puroR ≈xpb cadena abajo de mJkx usando BAC CT7-254m04	BHR
	4	Insertar hlgVk/Jk cadena arriba de Enhk/Ck de ratón usando la construcción de la etapa 3	Ligamiento
	5	Reemplazar cmR en la construcción de la etapa 4 con specR	BHR
	6	Insertar casete de selección de Neo en el extremo distante del locus de Igk de ratón usando BAC CT7-302g12	BHR
	7	Ligar rama de homología distante de ratón cadena arriba del inserto humano en la construcción de la etapa 6 para crear BACvec 6hVk	Ligamiento
16hVk	1	Insertar NeoR en el extremo distante de BAC RP11-1061b13	BHR
	2	Reemplazar cmR en la construcción de la etapa 1 con specR	BHR
	3	Insertar casete de selección de Hyg en el extremo distante del locus de Igk de ratón usando BAC CT7-302g12	BHR
	4	Ligar rama de homología distante de ratón cadena arriba del inserto humano de la construcción de la etapa 2 para crear BACvec 16hVk	Ligamiento
30hVk	1	Insertar HygR en el extremo distante de BAC RP11-99g6	BHR
	2	Reemplazar cmR en la construcción de la etapa 1 con specR	BHR
	3	Insertar casete de selección de Neo en el extremo distante de locus de Igk de ratón usando BAC CT7-302g12	BHR
	4	Ligar rama de homología distante de ratón cadena arriba del inserto humano de la construcción de la etapa 2 para crear BACvec 30hVk	Ligamiento
40hVk	1	Insertar NeoR en el extremo distante del locus de hlgH en BAC CTD-2559d6	BHR
	2	Reemplazar cmR en la construcción de la etapa 1 con specR	BHR
	3	Ligar rama de homología distante de ratón cadena arriba del locus de hlgH en la construcción de la etapa 2 para crear BACvec 40hVk	Ligamiento

Modificación de células madre embrionarias (ES) y generación de ratones. Se realizó dirección a células ES (F1H4) usando el método de ingeniería genética VELOCIGENE® como se ha descrito (Valenzuela *et al.*, 2003). La obtención de ratones de células ES modificadas por inyección de blastocistos (Valenzuela *et al.*, 2003) u 8 células (Poueymrou *et al.*, 2007) fue como se ha descrito. Las células ES diana y ratones se confirmaron mediante exploración de ADN a partir de células ES o ratones con conjuntos únicos de sondas y cebadores en un ensayo basado en PCR (por ejemplo, FIGURAS 3A, 3B y 3C). Todos los estudios de ratones fueron supervisados y aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional (IACUC) de Regeneron.

Análisis de cariotipo e hibridación fluorescente *in situ* (FISH). El análisis de cariotipo fue realizado por el depósito de células de Coriell (Instituto Coriell para Investigación Médica, Camden, NJ). Se realizó FISH en células ES diana como se ha descrito (Valenzuela *et al.*, 2003). Se marcaron sondas correspondientes a ADN de BAC de ratón o ADN de BAC humano mediante traslación de muesca (Invitrogen) con el espectro de nucleótidos dUTP marcados con fluorescencia naranja o espectro verde (Vysis).

Locus de genes variables de cadena pesada de inmunoglobulina. Se realizó humanización de la región variable de locus de cadena pesada en nueve etapas secuenciales mediante el reemplazo directo de aproximadamente tres millones de pares de bases (Mb) de secuencia genómica de ratón contigua que contiene todos los segmentos génicos V_H, D_H y J_H con aproximadamente un Mb de secuencia genómica humana contigua que contiene los segmentos génicos humanos equivalentes (FIGURA 1A y Tabla 1) usando tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos n.º 6.586.251 y Valenzuela *et al.*, 2003).

El intrón entre los segmentos génicos J_H y genes de región constante (el intrón J-C) contiene un potenciador de la transcripción (Neuberger, M.S. (1983). Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells. *Embo J* 2, 1373-1378) seguido de una región de repeticiones sencillas necesarias para la recombinación durante el intercambio de isotipo (Kataoka, T., Kawakami, T., Takahashi, N. y Honjo, T. (1980). Rearrangement of immunoglobulin gamma 1-chain gene and mechanism for heavy-chain class switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 919-923). El punto de unión entre la región V_H-D_H-J_H humana y la región C_H de ratón (el punto de unión próximo) se eligió para mantener el potenciador intrónico de cadena pesada de ratón y dominio de intercambio para conservar tanto expresión eficaz como intercambio de clase del locus de cadena pesada humanizado dentro del ratón. La posición de nucleótido exacta de este y posteriores puntos de unión en todos los reemplazos fue posible mediante el uso del método de ingeniería genética VELOCIGENE® (mencionado anteriormente), que empleó recombinación homóloga bacteriana conducida por oligonucleótidos sintetizados. Por tanto, el punto de unión próximo se situó aproximadamente 200 pb cadena abajo del último segmento génico J_H y el punto de unión distante se colocó a varios cientos de posiciones cadena arriba del segmento génico V_H más 5' del locus humano y aproximadamente 9 kb cadena abajo del segmento génico V_H1-86 de ratón, también conocido como J558.55. El segmento génico V_H1-86 de ratón (J558.55) es el segmento génico variable de cadena pesada más distante, que se ha indicado que es un pseudogén en ratones C57BL/6, pero potencialmente activo, aunque con una mala secuencia RSS, en el alelo 129 diana. Se ha indicado que el extremo distante del locus de cadena pesada de ratón puede contener elementos de control que regulan la expresión y/o reordenación del locus (Pawlitzky *et al.*, 2006).

Se consiguió una primera inserción de secuencia de ADN de inmunoglobulina humana en el ratón usando 144 kb del extremo próximo del locus de cadena pesada humano que contiene 3 segmentos génicos humanos V_H, los 27 D_H y 9 J_H insertados en el extremo próximo del locus IgH de ratón, con una supresión de 16,6 kb simultánea de secuencia genómica de ratón, usando aproximadamente 75 kb de ramas de homología de ratón (Etapa A, FIGURA 2A; Tablas 1 y 3, 3hV_H). Esta gran inserción de 144 kb y supresión de 16,6 kb concomitante se realizó en una única etapa (Etapa A) que se produjo con una frecuencia de 0,2 % (Tabla 3). Las células ES que se marcaron como objetivo correctamente se puntuaron mediante un ensayo de pérdida de alelo nativo (LONA) (Valenzuela *et al.*, 2003) usando sondas dentro de y que flanquean la secuencia de ratón suprimida y dentro de la secuencia humana insertada, y la integridad del inserto humano grande se verificó usando múltiples sondas que abarcaban la inserción completa (FIGURA 3A, 3B y 3C). Debido a que se anticiparon muchos ciclos de dirección a células ES secuenciales, los clones de células ES diana en esta etapa, y en todas las posteriores, se sometieron a análisis cariotípico (mencionado anteriormente) y solamente los clones que mostraban cariotipos normales en al menos 17 de 20 extensiones se utilizaron para etapas posteriores.

Las células ES diana de la Etapa A volvieron a ser diana con un BACvec que produjo una supresión de 19 kb en el extremo distante del locus de cadena pesada (Etapa B, FIGURA 2A). El BACvec de la Etapa B contenía un gen de resistencia a higromicina (hyg) a diferencia del gen de resistencia a neomicina (neo) contenido en el BACvec de la Etapa A. Los genes de resistencia de los dos BACvec se diseñaron de modo que, tras la dirección exitosa al mismo cromosoma, aproximadamente tres Mb del locus de gen variable de cadena pesada de ratón que contenía todos los segmentos génicos V_H de ratón distintos de V_H1-86 y todos los segmentos génicos D_H distintos de DQ52, así como los dos genes de resistencia, estaban flanqueados por sitios loxP; DQ52 y todos los segmentos génicos de cadena J_H de ratón se suprimieron en la Etapa A. Los clones de células ES que tuvieron doble diana en el mismo cromosoma se identificaron conduciendo el casete próximo de 3hV_H a homocigosidad en alto G418 (Mortensen, R. M. *et al.* (1992) Production of homozygous mutant ES cells with a single targeting construct. *Mol Cell Biol* 12, 2391-2395) y siguiendo la evolución del casete de hyg distante. Se han suprimido con éxito segmentos de ratón de hasta cuatro Mb de tamaño, que se han modificado de tal manera que estén flanqueados por sitios loxP, en células ES mediante expresión transitoria de CRE recombinasa con altas eficacias (hasta ≈11 %) incluso en ausencia de selección farmacológica (Zheng, B. *et al.* (2000) Engineering mouse chromosomes with CreloxP: range, efficiency, and somatic applications. *Mol Cell Biol* 20, 648-655). De una manera similar, los inventores han conseguido una supresión de tres Mb en 8 % de los clones de células ES después de expresión de CRE transitoria (Etapa C, FIGURA 2A; Tabla 3). La supresión se puntuó mediante el ensayo de LONA usando sondas en uno de los extremos de la secuencia de ratón suprimida, así como la pérdida de neo e hyg y la aparición de un producto de PCR a través del punto de supresión que contiene el único sitio de loxP restante. Además, la supresión se confirmó mediante hibridación de fluorescencia *in situ* (datos no mostrados).

El resto de la región variable de cadena pesada humana se añadió al alelo de 3hV_H en una serie de 5 etapas usando el método de ingeniería genética VELOCIGENE® (Etapas E-H, FIGURA 2B), implicando cada etapa la inserción precisa de hasta 210 kb de secuencias de genes humanos. Para cada etapa, el extremo próximo de cada nuevo BACvec se diseñó para solapar con las secuencias humanas más distantes de la etapa previa y el extremo distante de cada BACvec nuevo contenía la misma región distante de homología de ratón que se ha usado en la Etapa A. Los BACvec de las etapas D, F y H contenían casetes de selección de neo, mientras que los de las etapas E y G contenían casetes de selección de hyg, por lo tanto las selecciones se alternaron entre G418 e higromicina. La dirección en la Etapa D se ensayó mediante la pérdida del producto de PCR único a través del sitio de loxP distante del alelo híbrido 3hV_H. La dirección para las etapas E a I se ensayó mediante la pérdida del casete de selección previo. En la etapa final (Etapa I, FIGURA 2B), el casete de selección de neo, flanqueado por sitios Frt (McLeod, M. *et al.* (1986) Identification of the crossover site during FLP-mediated recombination in the *Saccharomyces cerevisiae* plasmid 2 microns circle. *Mol Cell Biol* 6, 3357-3367), se retiró mediante expresión de FLPe transitoria (Buchholz, F. *et al.* (1998) Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol* 16, 657-662). Las secuencias

humanas de los BACvec para las Etapas D, E y G se obtuvieron de dos BAC humanos parentales cada uno, mientras que los de las Etapas F y H fueron de BAC individuales. La conservación de secuencias humanas se confirmó en cada etapa usando múltiples sondas que abarcaban las secuencias humanas insertadas (como se ha descrito anteriormente, por ejemplo FIGURA 3A, 3B y 3C). Solamente los clones con cariotipo normal y potencial de línea germinal se pasaron a la siguiente etapa. Las células ES de la etapa final aún fueron capaces de contribuir a la línea germinal después de nueve manipulaciones secuenciales (Tabla 3). Los ratones homocigotos para cada uno de los alelos de cadena pesada fueron viables, parecían sanos y demostraron un sistema inmunitario humoral esencialmente de tipo silvestre (véase Ejemplo 3).

TABLA 3

Alelo Híbrido	Secuencia humana	Construcción de dirección	Eficacia de dirección	% de uso	V _H Total	V _H Funcional
3hV _H	144 kb	240 kb	0,2 %	5	3	3
3hV _H /DC	144 kb	110 kb	0,1 %	5	3	3
3hV _H -CRE	144 kb	-	8 %	5	3	3
18hV _H	340 kb	272 kb	0,1 %	25	18	12
39hV _H	550 kb	282 kb	0,2 %	60	39	25
53hV _H	655 kb	186 kb	0,4 %	65	53	29
70hV _H	850 kb	238 kb	0,5 %	90	70	39
80hV _H	940 kb	124 kb	0,2 %	100	80	43
80hV _H dNeo	940 kb	-	2,6 %	100	80	43

Locus de gen variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina. La región variable de cadena ligera κ se humanizó en ocho etapas secuenciales mediante el reemplazo directo de aproximadamente tres Mb de secuencia de ratón que contenía todos los segmentos génicos Vκ y Jκ con aproximadamente 0,5 Mb de secuencia humana que contenía los segmentos génicos Vκ y Jκ humanos próximos de una manera similar a la de la cadena pesada (FIGURA 1B; Tablas 2 y 4).

La región variable del locus de cadena ligera κ humana contiene dos repeticiones de 400 kb casi idénticas separadas por un espaciador de 800 kb (Weichhold, G. M. *et al.* (1993) The human immunoglobulin kappa locus consists of two copies that are organized in opposite polarity. Genomics 16, 503-511). Debido a que las repeticiones son tan similares, casi toda la diversidad de locus puede reproducirse en ratones usando la repetición próxima. Además, se ha indicado un alelo humano natural del locus de cadena ligera κ que carecía de la repetición distante (Schaible, G. *et al.* (1993) The immunoglobulin kappa locus: polymorphism and haplotypes of Caucasoid and non-Caucasoid individuals. Hum Genet 91,261-267). Los inventores reemplazaron aproximadamente tres Mb de secuencia de gen variable de cadena ligera κ de ratón por aproximadamente 0,5 Mb de secuencia de gen variable de cadena ligera κ humano para reemplazar eficazmente todos los segmentos génicos Vκ y Jκ de ratón con el Vκ humano próximo y todos los segmentos génicos Jκ humanos (FIGURA 2C y 2D; Tablas 2 y 4). A diferencia del método descrito en el Ejemplo 1 para el locus de cadena pesada, la región de gen de Vκ de ratón completa, que contiene todos los segmentos génicos Vκ y Jκ, se suprimió en un proceso de tres etapas antes de añadirse cualquier secuencia humana. En primer lugar, se introdujo un casete de neo en el extremo próximo de la región variable (Etapa A, FIGURA 2C). A continuación, se insertó un casete de hyg en el extremo distante del locus κ (Etapa B, FIGURA 2C). Se situaron de nuevo sitios LoxP dentro de cada casete de selección de modo que el tratamiento con CRE indujo la supresión de las 3 Mb restantes de la región Vκ de ratón junto con ambos genes de resistencia (Etapa C, FIGURA 2C).

Se insertó un fragmento genómico humano de aproximadamente 480 kb de tamaño que contenía la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina completa en cuatro etapas secuenciales (FIGURA 2D; Tablas 2 y 4), con hasta 150 kb de secuencia de cadena ligera κ de inmunoglobulina humana insertada en una única etapa, usando métodos similares a los empleados para la cadena pesada (véase Ejemplo 1). El gen de resistencia a higromicina final se retiró mediante expresión de FLPe transitoria. Como con la cadena pesada, se evaluaron clones de células ES diana para determinar la integridad del inserto humano completo, el cariotipo normal y potencial de línea germinal después de cada etapa. Se generaron ratones homocigotos para cada uno de los alelos de cadena ligera κ y se descubrió que estaban sanos y tenían apariencia normal.

TABLA 4

Alelo Híbrido	Secuencia humana	Construcción de dirección	Eficacia de dirección	% de uso	Vk Total	Vk Funcional
Igκ-PC	0	132 kb	1,1 %	-	-	-
Igκ-PC/DC	0	90 kb	0,4 %	-	-	-
Igκ-CRE	0	-	1 %	-	-	-
6hVk	110 kb	122 kb	0,3 %	14	6	4
16hVk	240 kb	203 kb	0,4 %	47	16	11
30hVk	390 kb	193 kb	0,1 %	70	30	18
40hVk	480 kb	185 kb	0,2 %	100	40	25
40hVk dHyg	480 kb	-	0,7 %	100	40	25

Ejemplo 2. Generación de ratones completamente humanizados mediante combinación de múltiples alelos de inmunoglobulina humanizados

En varios puntos, se microinyectaron células ES que portaban una parte de los repertorios variables de cadena pesada o cadena ligera κ de inmunoglobulina humana como se ha descrito en el Ejemplo 1 y los ratones resultantes se criaron para crear múltiples versiones de ratones VELOCIMMUNE® con fracciones progresivamente mayores de los repertorios de inmunoglobulinas de línea germinal humanas (Tabla 5; FIGURA 5A y 5B). Los ratones VELOCIMMUNE® 1 (V1) poseen 18 segmentos génicos V_H humanos y todos los segmentos génicos D_H y J_H humanos combinados con 16 segmentos génicos V_k humanos y todos los segmentos génicos J_k humanos. Los ratones VELOCIMMUNE® 2 (V2) y VELOCIMMUNE® (V3) tienen repertorios variables aumentados que portan un total de 39 V_H y 30 V_k, y 80 V_H y 40 V_k, respectivamente. Ya que las regiones genómicas que codifican los segmentos génicos V_H, D_H y J_H de ratón, y segmentos génicos V_k y J_k, se han reemplazado completamente, los anticuerpos producidos por cualquier versión de ratones VELOCIMMUNE® contienen regiones variables humanas ligadas a regiones constantes de ratón. Los loci de cadena ligera λ de ratón permanecen intactos en todas las versiones de los ratones VELOCIMMUNE® y actúan como un comparador para determinar la eficacia de la expresión de los diversos loci de cadena ligera κ VELOCIMMUNE®.

Se generaron ratones doblemente homocigotos para humanizaciones tanto de cadena pesada como de cadena ligera κ de inmunoglobulina a partir de un subconjunto de los alelos descritos en el Ejemplo 1. Todos los genotipos observados durante el transcurso de la cría para generar los ratones doblemente homocigotos se produjeron en proporciones aproximadamente mendelianas. La descendencia macho homocigota para cada uno de los alelos de cadena pesada humana mostró fertilidad reducida. La fertilidad reducida resultó de la pérdida de actividad de ADAM6 de ratón. El locus de gen variable de cadena pesada de ratón contiene dos genes de ADAM6 funcionales incluidos (ADAM6a y ADAM6b). Durante la humanización del locus de gen variable de cadena pesada de ratón, la secuencia genómica humana insertada contenía un pseudogén de ADAM6. ADAM6 de ratón puede ser necesario para la fertilidad, y por tanto la carencia de genes de ADAM6 de ratón en loci de genes variables de cadena pesada humanizados podría conducir a fertilidad reducida en estos ratones a pesar de la presencia del pseudogén humano. Los Ejemplos 7-9 describen el reemplazo preciso de genes de ADAM6 de ratón suprimidos de nuevo en un locus de gen variable de cadena pesada humanizado y la restauración de un nivel de tipo silvestre de fertilidad en ratones con un locus de inmunoglobulina de cadena pesada humanizado.

TABLA 5

Versión de ratón VELOCIMMUNE®	Cadena Pesada			Cadena Ligera κ		
	V _H Humano	Alelo	Gen de V _H 5'	V _k Humano	Alelo	Gen de V _k 5'
V1	18	18hV _H	V _H 1-18	16	16hV _k	V _k 1-16
V2	39	39hV _H	V _H 4-39	30	30hV _k	V _k 2-29
V3	80	80hV _H	V _H 3-74	40	40hV _k	V _k 2-40

Ejemplo 3. Poblaciones de linfocitos en ratones con genes de inmunoglobulina humanizados

Se evaluaron mediante citometría de flujo poblaciones de linfocitos B maduros en las tres versiones diferentes de ratones VELOCIMMUNE®.

Brevemente, se realizaron suspensiones celulares a partir de médula ósea, bazo y timo usando métodos convencionales. Las células se resuspendieron a 5x10⁵ células/ml en tampón de tinción FACS de BD Pharmingen, se

bloquearon con anti CD16/32 de ratón (BD Pharmingen), se tiñeron con el cóctel apropiado de anticuerpos y se fijaron con BD Cytotfix™ todos según las instrucciones del fabricante. Los sedimentos celulares finales se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de tinción y se analizaron usando un software BD FACSCALIBUR™ y BD CELLQUEST PRO™. Todos los anticuerpos (BD Pharmingen) se prepararon en una dilución masiva/cóctel y se añadieron hasta una concentración final de 0,5 mg/10⁵ células. Los cócteles de anticuerpos para tinción de médula ósea (A-D) fueron los siguientes: A: anti IgM^b de ratón-FITC, anti IgM^a de ratón-PE, anti CD45R (B220) de ratón-APC; B: anti CD43 (S7) de ratón-PE, anti CD45R (B220) de ratón-APC; C: anti CD24 (HSA) de ratón-PE; anti CD45R (B220) de ratón-APC; D: anti BP-1 de ratón-PE, anti CD45R (B220) de ratón-APC. Los cócteles de anticuerpos para tinción del bazo y ganglio linfático inguinal (E-H) fueron los siguientes: E: anti IgM^b de ratón-FITC, anti IgM^a de ratón-PE, anti CD45R (B220) de ratón-APC; F: anti Ig de ratón, cadena ligera L1, L2, L3-FITC, anti cadena ligera de Igk de ratón-PE, anti CD45R (B220) de ratón-APC; G: anti Ly6G/C de ratón-FITC, anti CD49b (DX5) de ratón-PE, anti CD11b de ratón-APC; H: anti CD4 (L3T4) de ratón-FITC, anti CD45R (B220) de ratón-PE, anti CD8a de ratón-APC. Los resultados se muestran en la FIGURA 6.

Se tiñeron linfocitos aislados de bazo o ganglio linfático de ratones VELOCIMMUNE® homocigotos para determinar la expresión en superficie de los marcadores B220 e IgM y se analizaron usando citometría de flujo (FIGURA 6). Los tamaños de las poblaciones de linfocitos B maduros B220⁺ IgM⁺ en todas las versiones de ratones VELOCIMMUNE® ensayadas fueron prácticamente idénticos a los de ratones de tipo silvestre, independientemente del número de segmentos génicos V_H que contuvieran. Además, los ratones que contenían loci de cadena pesada de inmunoglobulina humanizados híbridos homocigotos, incluso los que tenían solamente 3 segmentos génicos V_H pero loci de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón normales o ratones que contenían loci de cadena ligera κ humanizados híbridos homocigotos con loci de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón normales, también tenían números normales de células B220⁺ IgM⁺ en sus compartimentos periféricos (no mostrados). Estos resultados indican que los loci quiméricos con segmentos génicos variables humanos y regiones constantes de ratón pueden poblar completamente el compartimento de linfocitos B maduros. Además, el número de segmentos génicos variables en los loci de cadena pesada o cadena ligera κ, y por tanto la diversidad teórica del repertorio de anticuerpos, no se correlaciona con la capacidad para generar poblaciones de tipo silvestre de linfocitos B maduros. Por el contrario, los ratones con transgenes de inmunoglobulina completamente humana integrados de forma aleatoria y loci de inmunoglobulina de ratón inactivados tienen números reducidos de linfocitos B en estos compartimentos, dependiendo la gravedad del déficit del número de segmentos génicos variables incluidos en el transgén (Green, L. L., y Jakobovits, A. (1998). Regulation of B cell development by variable gene complexity in mice reconstituted with human immunoglobulin yeast artificial chromosomes. J Exp Med 188, 483-495). Esto demuestra que la estrategia de "humanización genética *in situ*" produce un resultado funcional fundamentalmente diferente que los transgenes integrados de forma aleatoria conseguidos en enfoque de "desactivación más transgénesis".

Exclusión alélica y elección de locus. La capacidad para mantener la exclusión alélica se examinó en ratones heterocigotos para diferentes versiones del locus de cadena pesada de inmunoglobulina humanizado.

La humanización de los loci de inmunoglobulina se llevó a cabo en una línea de ES F1 (F1H4 (Valenzuela *et al.*, 2003)), procedente de embriones heterocigotos 129S6/SvEvTac y C57BL/6NTac. Las secuencias génicas variables de línea germinal de cadena pesada humana se dirigen al alelo 129S6, que porta el haplotipo IgM^a, mientras que el alelo C57BL/6N de ratón sin modificar porta el haplotipo IgM^b. Estas formas alélicas de IgM pueden distinguirse por citometría de flujo usando anticuerpos específicos para los polimorfismos hallados en los alelos IgM^a o IgM^b. Como se muestra en la FIGURA 6 (fila inferior), los linfocitos B identificadas en ratones heterocigotos para cada versión del locus de cadena pesada humanizado solamente expresan un único alelo, IgM^a (el alelo humanizado) o IgM^b (el alelo de tipo silvestre). Esto demuestra que los mecanismos implicados en la exclusión alélica están intactos en ratones VELOCIMMUNE®. Además, el número relativo de linfocitos B positivos para el alelo humanizado (IgM^a) es aproximadamente proporcional al número de segmentos génicos V_H presentes. El locus de inmunoglobulina humanizado se expresa en aproximadamente 30 % de los linfocitos B en ratones heterocigotos VELOCIMMUNE® 1, que tienen 18 segmentos génicos V_H humanos y en el 50 % de los linfocitos B en ratones heterocigotos VELOCIMMUNE® 2 y 3 (no mostrados), con 39 y 80 segmentos génicos V_H humanos, respectivamente. Notablemente, la relación de células que expresan el alelo de ratón humanizado frente al de tipo silvestre (0,5 para ratones VELOCIMMUNE® 1 y 0,9 para ratones VELOCIMMUNE® 2) es mayor que la relación del número de segmentos génicos variables contenidos en los loci humanizados frente a tipo silvestre (0,2 para ratones VELOCIMMUNE® 1 y 0,4 para ratones VELOCIMMUNE® 2). Esto puede indicar que la probabilidad de elección de alelo es intermedia entre una elección aleatoria de uno o el otro cromosoma y una elección aleatoria de cualquier RSS de segmento V particular. Además, puede haber una fracción de linfocitos B, pero no todas, en la que un alelo se hace accesible para recombinación, completa el proceso y detiene la recombinación antes de que el otro alelo se haga accesible. Además, la distribución uniforme de células que tienen IgM en superficie (sIgM) procedente del locus de cadena pesada humanizado híbrido o el locus de cadena pesada de ratón de tipo silvestre es una prueba de que el locus híbrido actúa a un nivel normal. Por el contrario, los transgenes de inmunoglobulina humana integrados de forma aleatoria compiten poco con loci de inmunoglobulina de ratón de tipo silvestre (Bruggemann, M. *et al.* (1989) A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. PNAS 86, 6709-6713; Green *et al.*, 1994; Tuailon, N. *et al.* (1993) Human immunoglobulin heavy-chain minilocus recombination in transgenic mice: gene-segment use in mu and gamma transcripts. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 3720-3724). Esto demuestra adicionalmente que las inmunoglobulinas producidas por ratones VELOCIMMUNE® son funcionalmente diferentes a

las producidas por transgenes integrados de forma aleatoria en ratones preparados mediante enfoques de "desactivación más transgénesis".

No están disponibles polimorfismos de las regiones C κ en 129S6 o C57BL/6N para examinar la exclusión alélica de loci de cadena ligera κ humanizados frente a no humanizados. Sin embargo, los ratones VELOCIMMUNE® poseen todos loci de cadena ligera λ de ratón de tipo silvestre, por lo tanto, es posible observar si el reordenamiento y la expresión de loci de cadena ligera κ humanizados pueden evitar la expresión de cadena ligera λ de ratón. La relación del número de células que expresan la cadena ligera κ humanizada en relación con el número de células que expresan cadena ligera λ de ratón permaneció relativamente sin cambios en ratones VELOCIMMUNE® en comparación con ratones de tipo silvestre, independientemente del número de segmentos génicos V κ humanos insertados en el locus de cadena ligera κ (FIGURA 6, tercera fila desde arriba). Además no hubo ningún aumento del número de células doble positivas (κ más λ), lo que indica que la recombinación productiva en los loci de cadena ligera κ híbridos da como resultado supresión apropiada de la recombinación de los loci de cadena ligera λ de ratón. Por el contrario, los ratones que contienen transgenes de cadena ligera κ integrados de forma aleatoria con loci de cadena ligera κ de ratón inactivados pero loci de cadena ligera λ de ratón de tipo silvestre muestran relaciones λ/κ drásticamente aumentadas (Jakobovits, 1998), lo que implica que los transgenes de cadena ligera κ introducidos no actúan bien en dichos ratones. Esto demuestra adicionalmente el diferente resultado funcional observado en inmunoglobulinas realizadas por ratones VELOCIMMUNE® en comparación con las realizadas por ratones "desactivados más transgénicos".

Desarrollo de linfocitos B. Debido a que las poblaciones de linfocitos B maduros en ratones VELOCIMMUNE® se asemejan a las de ratones de tipo silvestre (descritas anteriormente), es posible que los defectos en la diferenciación temprana de linfocitos B estén compensados por la expansión de poblaciones de linfocitos B maduros. Los diversos estadios de diferenciación de linfocitos B se examinaron mediante análisis de poblaciones de linfocitos B usando citometría de flujo. La Tabla 6 expone la relación de la fracción de células en cada linaje de linfocitos B definido por FACS, usando marcadores de superficie celular específicos, en ratones VELOCIMMUNE® en comparación con compañeros de camada de tipo silvestre.

El desarrollo temprano de los linfocitos B se produce en la médula ósea, y diferentes estadios de diferenciación de linfocitos B se caracterizan por cambios en los tipos y cantidades de expresión de marcadores de superficie celular. Estas diferencias en la expresión en superficie se correlacionan con los cambios moleculares que se producen en los loci de inmunoglobulina dentro de la célula. La transición de prolinfocito B a prelinfocito B requiere la reordenación y expresión con éxito de proteína de cadena pesada funcional, mientras que la transición del estadio pre B a B maduro está gobernada por la reordenación y expresión correcta de una cadena ligera κ o λ . Por tanto, puede detectarse transición ineficaz entre estadios de diferenciación de linfocitos B mediante cambios en las poblaciones relativas de linfocitos B en un estadio dado.

TABLA 6

Versión de ratones VELOCIMMUNE®	Médula Ósea				Bazo	
	pro-B CD43 ^{alto} B220 ^{bajo}	pre-B CD24 ^{alto} B220 ^{bajo}	Inmaduro B220 ^{bajo} IgM ⁺	Maduro B220 ^{alto} IgM ⁺	Emergente B220 ^{alto} IgM ⁺ IgD ⁺	Maduro B220 ^{alto} IgM ⁺
V1	1,1	1,0	0,9	1,0	1,1	1,0
V2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
V3	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,1

No se observó ningún defecto importante en la diferenciación de linfocitos B en ninguno de los ratones VELOCIMMUNE®. La introducción de segmentos génicos de cadena pesada humanos no parece afectar a la transición de pro B a pre B, y la introducción de segmentos génicos de cadena ligera κ humanos no afecta a la transición pre B a B en ratones VELOCIMMUNE®. Esto demuestra que las moléculas de inmunoglobulina "quiméricas inversas" que poseen regiones variables humanas y constantes de ratón actúan de forma normal en el contexto de la señalización de linfocitos B y moléculas correceptoras que conducen a diferenciación de linfocitos B apropiada en un ambiente de ratón. Por el contrario, el equilibrio entre las diferentes poblaciones durante la diferenciación de linfocitos B está alterado en diversos grados en ratones que contienen transgenes de inmunoglobulina integrados aleatoriamente y loci de cadena pesada o cadena ligera κ endógenos inactivados (Green y Jakobovits, 1998).

Ejemplo 4. Repertorio de genes variables en ratones de inmunoglobulina humanizada

Se analizó el uso de segmentos génicos variables humanos en el repertorio de anticuerpos humanizados de ratones VELOCIMMUNE® mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) de regiones variables humanas de múltiples fuentes incluyendo esplenocitos y células de hibridoma. Se determinaron la secuencia de región variable, uso de segmento génico, hipermutación somática y diversidad de unión de segmentos génicos de

región variable reordenados.

Brevemente, se extrajo ARN total de 1×10^7 - 2×10^7 esplenocitos o aproximadamente 10^4 - 10^5 células de hibridoma usando TRIZOL™ (Invitrogen) o Mini Kit Qiagen RNEASY™ (Qiagen) y se usaron como cebadores específicos de región constante de ratón usando el sistema de RT-PCR de una etapa SUPERScript™ III (Invitrogen). Las reacciones se llevaron a cabo con 2-5 µl de ARN de cada muestra usando los cebadores específicos constantes 3' anteriormente mencionados emparejados con cebadores líderes agrupados para cada familia de regiones variables humanas tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera κ , por separado. Los volúmenes de reactivos y cebadores, y las condiciones de RT-PCR/PCR se realizaron según las instrucciones del fabricante. Las secuencias de cebadores se basaron en múltiples fuentes (Wang, X. y Stollar, B.D. (2000) Human immunoglobulin variable region gene analysis by single cell RT-PCR. J Immunol Methods 244:217-225; Ig-primer sets, Novagen). Cuando fue apropiado, se llevaron a cabo reacciones de PCR secundarias anidadas con cebadores de marco conservado específicos de familia agrupada y el mismo cebador específico de constante de inmunoglobulina 3' de ratón usado en la reacción primaria. Se analizaron alícuotas (5 µl) de cada reacción mediante electroforesis en agarosa y los productos de reacción se purificaron de agarosa usando un kit de extracción en gel MONTAGE™ (Millipore). Se clonaron productos purificados usando el sistema de clonación TOPO™ TA (Invitrogen) y se transformaron en células de *E. coli* DH10β mediante electroporación. Se seleccionaron clones individuales de cada reacción de transformación y se cultivaron en cultivos de caldo LB de 2 ml con selección por antibióticos durante una noche a 37 °C. El ADN plasmídico se purificó de cultivos bacterianos mediante un enfoque basado en kit (Qiagen).

Uso de genes variables de inmunoglobulina. Se secuenció ADN plasmídico de clones tanto de cadena pesada como de cadena ligera κ con cebadores inversos T7 o M13 en el Analizador Genético ABI 3100 (Applied Biosystems). Los datos de secuencias en bruto se importaron en SEQUENCHER™ (v4.5, Gene Codes). Cada secuencia se ensambló en contig y se alineó con secuencias de inmunoglobulina humana usando la función de búsqueda de IMGT V-Quest (Brochet, X., Lefranc, M.P., y Giudicelli, V. (2008). IMGT/VQUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. Nucleic Acids Res 36, W503-508) para identificar el uso de segmentos V_H, D_H, J_H y V_κ, J_κ humanos. Las secuencias se compararon con secuencias de línea germinal para análisis de hipermutación somática y punto de unión de recombinación.

Se generaron ratones a partir de células ES que contenían la modificación de cadena pesada inicial (alelo híbrido 3hV_H-CRE, parte inferior de la FIGURA 2A) mediante complementación de RAG (Chen, J. *et al.* (1993) RAG-2-deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 4528-4532), y se preparó ADNc a partir de ARN de esplenocitos. El ADNc se amplificó usando conjuntos de cebadores (descritos anteriormente) específicos para el ARNm de cadena pesada quimérico predicho que surgiría por recombinación de V(D)J en los segmentos génicos humanos insertados y posterior corte y empalme con dominios constantes de IgM o IgG de ratón. Las secuencias procedentes de estos clones de ADNc (no mostrados) demostraron que se había producido recombinación de V(D)J apropiada en las secuencias de genes variables humanos, que los segmentos génicos V(D)J humanos reordenados se habían cortado y empalmado de forma apropiada en fase con dominios constantes de ratón y que se había producido recombinación de cambio de clase. Se realizó análisis de secuencia adicional de productos de ARNm de loci de inmunoglobulina híbridos posteriores.

En un experimento similar, se separaron linfocitos B de ratones de tipo silvestre no inmunizados y VELOCIMMUNE® mediante citometría de flujo basándose en la expresión en superficie de B220 e IgM o IgG. Se agruparon las células B220⁺ IgM⁺ o IgG⁺ de superficie (slgG⁺) y se obtuvieron secuencias de V_H y V_κ después de amplificación por RT-PCR y clonación (descrita anteriormente). Se registró el uso de genes representativo en un conjunto de ADNc amplificados por RT-PCR de ratones VELOCIMMUNE® 1 no inmunizados (Tabla 7) y ratones VELOCIMMUNE® 3 (Tabla 8) (*RSS defectuoso; †ausente o pseudogén)

TABLA 7

V _H	Observado	D _H	Observado	V _κ	Observado
1-18	3	1-1	1	1-16	2
1-17P	0	2-2	2	3-15	1
3-16*	0	3-3	4	1-12	5
3-15	13	4-4	0	3-11	1
3-13	9	5-5	0	1-9	5
3-11	6	5-18	4	1-8	2
3-9	8	6-6	5	3-7*	0
1-8	6	1-7	7	1-6	5
3-7	2	2-8	0	1-5	8
2-5	2	3-9	4	5-2	6

V _H	Observado		D _H	Observado		V _k	Observado
1-3	0		3-10	2		4-1	8
1-2	11		4-11	1		J _k Observado	
6-1	5		5-12	1			
J _H Observado			6-13	3		1	12
			1-14	0		2	10
1	2		2-15	0		3	5
2	1		3-16	1		4	10
3	8		4-17	0		5	0
4	33		6-19	2			
5	5		1-20	2			
6	16		2-21	1			
			3-22	0			
			4-23	2			
			5-24	1			
			6-25	1			
			1-26	6			
			7-27	10			

TABLA 8

V _H	Observado	D _H	Observado	V _k	Observado
7-81†	0	1-1	7	2-40	1
3-74†	0	2-2	8	1-39	34
3-73	1	3-3	9	1-37	2
3-72	2	4-4	4	1-33	35
2-70	2	5-5	6	2-30	8
1-69	3	5-18	6	2-29	2
3-66	1	6-6	29	2-28	7
3-64	1	1-7	30	1-27	5
4-61	1	2-8	4	2-24	7
4-59	10	3-9	8	6-21*	3
1-58	0	3-10	10	3-20	10
3-53	0	4-11	4	1-17	13
5-51	5	5-12	5	1-16	10
3-49	2	6-13	17	3-15	13
3-48	7	1-14	2	1-12	13
1-46	1	2-15	3	3-11	13
1-45	0	3-16	4	1-9	11
3-43	10	4-17	3	1-8	1
4-39	4	6-19	8	3-7*	0
3-38*	0	1-20	3	1-6	6
3-35*	0	2-21	1	1-5	7
4-34	8	3-22	5	5-2	0

V _H	Observado	D _H	Observado	V _K	Observado
3-33	14	4-23	2	4-1	21
4-31	4	5-24	2	J _K Observado	
3-30	13	6-25	2	1	50
4-28	0	1-26	17	2	37
2-26	0	7-27	7	3	28
1-24	3	J _H Observado		4	64
3-23	18	1	2	5	22
3-21	0	2	8		
3-20	0	3	26		
1-18	4	4	95		
1-17P	1	5	11		
3-16*	0	6	58		
3-15	13				
3-13	6				
3-11	5				
3-9	31				
1-8	7				
3-7	11				
2-5	1				
1-3	0				
1-2	6				
6-1	9				

Como se muestra en las Tablas 7 y 8, se utilizan casi todos los segmentos génicos V_H, D_H, J_H, V_K y J_K humanos funcionales. De los segmentos génicos variables funcionales descritos pero no detectados en los ratones VELOCIMMUNE® de este experimento, se ha indicado que varios poseen secuencias señal de recombinación (RSS) defectuosas y, por tanto, no se esperaría que se expresaran (Feeney, A.J. (2000) Factors that influence formation of B cell repertoire. Immunol Res 21, 195-202). El análisis de varios otros conjuntos de secuencias de inmunoglobulina de diversos ratones VELOCIMMUNE®, aislados de repertorios tanto sin tratamiento previo como inmunizados, ha mostrado uso de estos segmentos génicos, aunque a frecuencias menores (datos no mostrados). Los datos de uso de genes agregados han mostrado que todos los segmentos génicos V_H, D_H, J_H, V_K y J_K humanos funcionales contenidos en ratones VELOCIMMUNE® se han observado en diversos repertorios sin exposición previa e inmunizados (datos no mostrados). Aunque el segmento génico V_H7-81 humano se ha identificado en el análisis de secuencias del locus de cadena pesada humana (Matsuda, F. *et al.* (1998) The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. J Exp Med 188, 2151-2162), no está presente en los ratones VELOCIMMUNE® como se ha confirmado mediante resecuenciación del genoma completo de ratón VELOCIMMUNE® 3.

Se sabe que las secuencias de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos muestran una variabilidad excepcional, especialmente en segmentos polipeptídicos cortos dentro del dominio variable reordenado. Estas regiones, conocidas como regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDR) crean el sitio de unión para el antígeno en la estructura de la molécula de anticuerpo. Las secuencias polipeptídicas intermedias se denominan regiones marco conservadas (FR). Existen tres CDR (CDR1, CDR2, CDR3) y 4 FR (FR1, FR2, FR3, FR4) en cadenas tanto pesadas como ligeras. Una CDR, CDR3, es única porque esta CDR se crea mediante la recombinación de los segmentos génicos tanto V_H, D_H y J_H como V_K y J_K y genera una cantidad suficiente de diversidad de repertorio antes de encontrarse con el antígeno. Esta unión es imprecisa debido tanto a supresiones de nucleótidos mediante la actividad exonucleasa como a adiciones no codificadas en el molde mediante desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) y, por tanto, permite que se produzcan secuencias novedosas a partir del proceso de recombinación. Aunque las FR pueden mostrar mutación somática sustancial debido a la alta capacidad de mutación de la región variable en su conjunto, la variabilidad no se distribuye, sin embargo, uniformemente por toda la región variable. Las CDR son regiones concentradas y localizadas de alta variabilidad en la superficie de la molécula de anticuerpo que permiten la unión a antígeno. Se muestran secuencias de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos seleccionados de ratones VELOCIMMUNE® alrededor de punto de unión de CDR3 que demuestran diversidad de unión en la FIGURA 7A y 7B, respectivamente.

Como se muestra en la FIGURA 7A, se observan adiciones de nucleótidos no codificadas por molde (adiciones N) en las uniones tanto V_H-D_H como D_H-J_H en anticuerpos de ratones VELOCIMMUNE®, lo que indica la función apropiada de TdT con los segmentos humanos. Los puntos finales de los segmentos V_H, D_H y J_H en relación con sus homólogos de línea germinal indican que también se ha producido actividad exonucleasa. A diferencia del locus de cadena pesada, las reordenaciones de cadena ligera κ humana muestran pocas o ninguna adición de TdT en CDR3, que se forma mediante la recombinación de los segmentos V_k y J_k (FIGURA 7B). Esto es esperable debido a la ausencia de expresión de TdT en ratones durante reordenaciones de cadena ligera en la transición de prelinfocito B a linfocito B. La diversidad observada en la CDR3 de regiones V_k humanas reordenadas se introduce predominantemente mediante actividad exonucleasa durante el acontecimiento de recombinación.

Hipermutación somática. Se añade diversidad adicional a las regiones variables de genes de inmunoglobulina reordenados durante la reacción de centro germinal por un proceso denominado hipermutación somática. Los linfocitos B que expresan regiones variables mutadas de forma somática compiten con otros linfocitos B por el acceso al antígeno presentado por las células dendríticas foliculares. Los linfocitos B con mayor afinidad por el antígeno se expandirán adicionalmente y experimentarán intercambio de clase antes de salir a la periferia. Por tanto, los linfocitos B que expresan isotipos intercambiados habitualmente se han encontrado con el antígeno y han experimentado reacciones de centro germinal y tendrán mayores números de mutaciones en relación con linfocitos B vírgenes. Además, se esperaría que las secuencias de región variable de linfocitos B sIgM⁺ predominantemente vírgenes tuvieran relativamente menos mutaciones que secuencias variables de linfocitos B sIgG⁺ que se han sometido a selección de antígenos.

Se compararon las secuencias de clones de V_H o V_k aleatorios de linfocitos B sIgM⁺ o sIgG⁺ de ratones VELOCIMMUNE® sin inmunizar o linfocitos B sIgG⁺ de ratones inmunizados con sus segmentos génicos variables de línea germinal y se anotaron los cambios relativos a la secuencia de línea germinal. Las secuencias de nucleótidos resultantes se tradujeron por ordenador y también se anotaron las mutaciones que conducían a cambios de aminoácidos. Los datos se cotejaron con respecto a todas las regiones variables y se calculó el porcentaje de cambio en una posición dada (FIGURA 8).

Como se muestra en la FIGURA 8, las regiones variables de cadena pesada humana procedentes de linfocitos B sIgG⁺ de ratones VELOCIMMUNE® sin inmunizar muestran muchos más nucleótidos en relación con linfocitos B sIgM⁺ de los mismos grupos de esplenocitos, y las regiones variables de cadena pesada procedentes de ratones inmunizados muestran aún más cambios. El número de cambios aumenta en las regiones determinantes de complementariedad (CDR) en relación con las regiones marco conservadas, lo que indica selección de antígenos. Las secuencias de aminoácidos correspondientes de las regiones variables de cadena pesada humanas también muestran números significativamente mayores de mutaciones en IgG frente a IgM y aún más en IgG inmunizados. Estas mutaciones parecen ser de nuevo más frecuentes en las CDR en comparación con las secuencias de marco conservado, lo que sugiere que los anticuerpos se seleccionaron por antígeno *in vivo*. Se ve un aumento similar en el número de mutaciones de nucleótidos y aminoácidos en las secuencias V_k procedentes de linfocitos B IgG⁺ de ratones inmunizados.

El uso de genes y la hipermutación somática observados en ratones VELOCIMMUNE® demuestran que esencialmente todos los segmentos génicos presentes son capaces de reordenarse para formar anticuerpos quiméricos inversos completamente funcionales en estos ratones. Además, los anticuerpos VELOCIMMUNE® participan completamente en el sistema inmunitario del ratón para experimentar selección de afinidad y maduración para crear anticuerpos humanos completamente maduros que pueden neutralizar con eficacia su antígeno diana. Los ratones VELOCIMMUNE® son capaces de montar respuestas inmunitarias robustas para múltiples clases de antígenos que dan como resultado uso de una amplia serie de anticuerpos humanos que son tanto de alta afinidad como adecuados para su uso terapéutico (datos no mostrados).

Ejemplo 5. Análisis de estructura linfoide e isotipos de suero

Las estructuras generales del bazo, ganglios linfáticos inguinales, placas de Peyer y timo de muestras tisulares de ratones de tipo silvestre o VELOCIMMUNE® con H y E se examinaron por microscopía óptica. Los niveles de isotipos de inmunoglobulina en suero recogido de ratones de tipo silvestre y VELOCIMMUNE® se analizaron usando tecnología LUMINEX™.

Estructura de órganos linfoides. La estructura y función de los tejidos linfoides depende en parte del desarrollo apropiado de células hematopoyéticas. Un defecto en el desarrollo o la función de linfocitos B puede mostrarse como una alteración en la estructura de los tejidos linfoides. Tras el análisis de secciones tisulares teñidas, no se identificó ninguna diferencia significativa en la apariencia de órganos linfoides secundarios entre los ratones de tipo silvestre y VELOCIMMUNE® (datos no mostrados).

Niveles de inmunoglobulina en suero. El nivel de expresión de cada isotipo es similar en ratones de tipo silvestre y VELOCIMMUNE® (FIGURAS 9A, 9B y 9C). Esto demuestra que la humanización de los segmentos génicos variables no tuvo ningún efecto adverso evidente en el cambio de clase o la expresión y secreción de inmunoglobulina y por lo tanto mantienen aparentemente todas las secuencias de ratón endógenas necesarias para estas funciones.

Ejemplo 6. Inmunización y producción de anticuerpos en ratones de inmunoglobulina inmunizados

Se inmunizaron diferentes versiones de ratones VELOCIMMUNE® con antígeno para examinar la respuesta humoral a la exposición a antígeno ajeno.

Inmunización y desarrollo de hibridoma. Los ratones VELOCIMMUNE® y de tipo silvestre pueden inmunizarse con un antígeno en forma de proteína, ADN, una combinación de ADN y proteína, o células que expresan el antígeno. Los animales se refuerzan habitualmente cada tres semanas para un total de dos a tres veces. Después de cada refuerzo de antígeno, se recogen muestras de suero de cada animal y se analizan para determinar las respuestas de anticuerpos específicos de antígeno mediante determinación de título en suero. Antes de la fusión, los ratones recibieron un refuerzo prefusión final de 5 µg de proteína o ADN, según se desee, mediante inyecciones intraperitoneales y/o intravenosas. Se recogen esplenocitos y se fusionan con células de mieloma Ag8.653 en una cámara de electrofusión según el protocolo sugerido por el fabricante (Cyto Pulse Sciences Inc., Glen Burnie, MD). Diez días después del cultivo, los hibridomas se exploran para determinar la especificidad de antígeno usando un ensayo ELISA (Harlow, E. y Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Nueva York). Como alternativa, se aíslan linfocitos B específicos de antígeno directamente de ratones VELOCIMMUNE® inmunizados y se exploran usando técnicas convencionales, incluyendo las descritas aquí, para obtener anticuerpos humanos específicos para un antígeno de interés

Determinación de títulos en suero. Para supervisar la respuesta de suero anti antígeno de los animales, se recogen muestras de suero aproximadamente 10 días después de cada refuerzo y los títulos se determinan usando ELISA específico de antígeno. Brevemente, se recubren placas de 96 pocillos Nunc MAXISORP™ con 2 µg/ml de antígeno durante una noche a 4 °C y se bloquean con albúmina de suero bovino (Sigma, St. Louis, MO). Se permite que las muestras de suero en diluciones triples en serie se unan con las placas durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan después con PBS que contiene Tween-20 0,05 % y el IgG unido se detecta usando Fc anti ratón de cabra conjugado con HRP (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA) para determinar el título de IgG total, o anticuerpos policlonales específicos de isotipo o específicos de cadena ligera marcados con biotina (SouthernBiotech Inc.) para determinar los títulos específicos de isotipo, respectivamente. Para anticuerpos marcados con biotina, después del lavado de la placa, se añade estreptavidina conjugada con HRP (Pierce, Rockford, IL). Todas las placas se desarrollan usando sustratos colorimétricos tales como BD OPTeia™ (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Después la reacción se detiene con ácido fosfórico 1 M, se registran absorciones ópticas a 450 nm y los datos se analizan usando software PRISM™ de Graph Pad. Las diluciones necesarias para obtener el doble de la señal de fondo se definen como título.

En un experimento, se inmunizaron ratones VELOCIMMUNE® con receptor de interleucina 6 humano (hIL-6R). Se muestra un conjunto representativo de títulos en suero para ratones VELOCIMMUNE® y de tipo silvestre inmunizados con hIL-6R en la FIGURA 10A y 10B.

Los ratones VELOCIMMUNE® y de tipo silvestre montaron respuestas fuertes hacia el IL-6R con intervalos de títulos similares (FIGURA 10A). Varios ratones de las cohortes de VELOCIMMUNE® y de tipo silvestre alcanzaron una respuesta máxima después de un único refuerzo de antígeno. Estos resultados indican que la fuerza de la respuesta inmunitaria y la cinética para este antígeno fueron similares en los ratones VELOCIMMUNE® y de tipo silvestre. Estas respuestas de anticuerpos específicos de antígeno se analizaron adicionalmente para examinar los isotipos particulares de los anticuerpos específicos de antígeno hallados en los sueros. Los grupos tanto de VELOCIMMUNE® como de tipo silvestre indujeron predominantemente una respuesta de IgG1 (FIGURA 10B), lo que sugiere que el cambio de clase durante la respuesta humoral es similar en ratones de cada tipo.

Determinación de afinidad de unión de anticuerpo a antígeno en solución. Un ensayo de competición en solución basado en ELISA se diseña típicamente para determinar la afinidad de unión de anticuerpo con el antígeno.

Brevemente, los anticuerpos en medio acondicionado se premezclan con diluciones en serie de proteína antigénica que varían de 0 a 10 mg/ml. Las soluciones de la mezcla de anticuerpo y antígeno se incuban después durante dos a cuatro horas a temperatura ambiente hasta alcanzar equilibrios de unión. Las cantidades de anticuerpo libre en las mezclas se miden después usando un ELISA de sándwich cuantitativo. Se recubren placas MAXISORB™ de noventa y seis pocillos (VWR, West Chester, PA) con 1 µg/ml de proteína antigénica en solución de PBS durante una noche a 4 °C seguido de bloqueo no específico por BSA. Las soluciones de mezcla de anticuerpo-antígeno se transfieren después a estas placas seguido de incubación durante una hora. Las placas se lavan después con tampón de lavado y los anticuerpos unidos a placa se detectaron con un reactivo de anticuerpo policlonal de cabra anti IgG de ratón conjugado con HRP (Jackson Immuno Research Lab) y se revelaron usando sustratos colorimétricos tales como BD OPTeia™ (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Después la reacción se detiene con ácido fosfórico 1 M, se registran las absorciones ópticas a 450 nm y los datos se analizan usando software PRISM™ de Graph Pad. La dependencia de las señales de las concentraciones de antígeno en solución se analiza con un análisis de ajuste de 4 parámetros y se presenta como CI₅₀, la concentración de antígeno necesaria para conseguir 50 % de reducción de la señal de las muestras de anticuerpo sin la presencia de antígeno en solución.

En un experimento, se inmunizaron ratones VELOCIMMUNE® con hIL-6R (como se ha descrito anteriormente). Las FIGURAS 11A y 11B muestran un conjunto representativo de mediciones de afinidad para anticuerpos anti hIL6R de ratones VELOCIMMUNE® y de tipo silvestre.

Después de que los ratones inmunizados reciben un tercer refuerzo de antígeno, se determinan los títulos en suero mediante ELISA. Se aíslan esplenocitos de cohortes de ratones de tipo silvestre y VELOCIMMUNE® seleccionadas y se fusionan con células de mieloma Ag8.653 para formar hibridomas y cultivar con selección (como se ha descrito anteriormente). De un total de 671 hibridomas anti IL-6R producidos, se descubrió que 236 expresaban anticuerpos específicos de antígeno. Se usaron medios recogidos de pocillos positivos para antígeno para determinar la afinidad de unión del anticuerpo con el antígeno usando un ELISA de competición en solución. Los anticuerpos procedentes de ratones VELOCIMMUNE® muestran un amplio intervalo de afinidad en la unión con antígeno en solución (FIGURA 11A). Asimismo, se descubrió que 49 de 236 hibridomas anti IL-6R bloqueaban la unión de IL-6 con el receptor en un bioensayo *in vitro* (datos no mostrados). Además, estos 49 anticuerpos de bloqueo anti IL-6R mostraban un intervalo de afinidades de solución altas similar al de anticuerpos de bloqueo procedentes de la inmunización en paralelo de ratones de tipo silvestre (FIGURA 11B).

Ejemplo 7. Construcción de un vector de dirección ADAM6 de ratón

Se construyó un vector de dirección para inserción de genes de ADAM6a y ADAM6b de ratón en un locus de cadena pesada humanizado usando tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® (mencionado anteriormente) para modificar un Cromosoma Artificial Bacteriano (BAC) 929d24 obtenido del Dr. Fred Alt (Universidad de Harvard). Se modificó por ingeniería genética ADN de BAC 929d24 para contener fragmentos genómicos que contenían los genes de ADAM6a y ADAM6b de ratón y un casete de higromicina para supresión dirigida de un pseudogén de ADAM6 humano (hADAM6Ψ) localizado entre los segmentos génicos V_H1-2 y V_H6-1 humanos de un locus de cadena pesada humanizado (FIGURA 12).

En primer lugar, se subclonó un fragmento genómico que contenía el gen de ADAM6b de ratón, -800 pb de secuencia cadena arriba (5') y -4800 pb de secuencia cadena abajo (3') a partir del clon de BAC 929d24. Por separado se subclonó un segundo fragmento genómico que contenía el gen de ADAM6a de ratón, -300 pb de secuencia cadena arriba (5') y -3400 pb de secuencia cadena abajo (3') del clon de BAC 929d24. Los dos fragmentos genómicos que contenían los genes de ADAM6b y ADAM6a de ratón se ligaron con un casete de higromicina flanqueado por sitios de recombinación Frt para crear el vector de dirección (Vector de Dirección ADAM6 de ratón, FIGURA 20; SEQ ID NO: 3). Se introdujeron por ingeniería genética sitios de enzimas de restricción diferentes en el extremo 5' del vector de dirección detrás del gen de ADAM6b de ratón y en el extremo 3' detrás del gen de ADAM6a de ratón (parte inferior de la FIGURA 12) para ligamiento en el locus de cadena pesada humanizado.

Se realizó una modificación separada a un clon de BAC que contenía un reemplazo del locus de cadena pesada de ratón con el locus de cadena pesada humano, que incluía el pseudogén de ADAM6 humano localizado entre los segmentos génicos V_H1-2 y V_H6-1 humanos del locus humanizado para el ligamiento posterior del vector de dirección de ADAM6 de ratón (FIGURA 13).

Brevemente, se modificó por ingeniería genética un casete de neomicina flanqueado por sitios de recombinación *loxP* para contener ramas de homología que contenían secuencia genómica humana en las posiciones 3' del segmento génico V_H1-2 humano (5' con respecto a hADAM64Ψ) y 5' del segmento génico V_H6-1 humano (3' con respecto a hADAM6Ψ; véase parte media de la FIGURA 13). La localización del sitio de inserción de esta construcción de dirección fue aproximadamente 1,3 kb 5' y ~350 pb 3' del pseudogén de ADAM6 humano. La construcción de dirección también incluyó los mismos sitios de restricción que el vector de dirección ADAM6 de ratón para permitir el ligamiento de BAC posterior entre el clon de BAC modificado que contiene la supresión del pseudogén de ADAM6 humano y el vector de dirección de ADAM6 de ratón.

Tras la digestión de ADN de BAC procedente de ambas construcciones, los fragmentos genómicos se ligaron entre sí para construir un clon de BAC modificado por ingeniería genética que contenía un locus de cadena pesada humanizado que contenía una secuencia genómica situada de forma ectópica que comprendía secuencias de nucleótidos de ADAM6a y ADAM6b de ratón. La construcción de dirección final para la supresión de un gen de ADAM6 humano en un locus de cadena pesada humanizado e inserción de secuencias de ADAM6a y ADAM6b de ratón en células ES contenía, de 5' a 3', un fragmento genómico 5' que contenía ~13 kb de secuencia genómica humana 3' del segmento génico V_H1-2 humano, ~800 pb de secuencia genómica de ratón cadena abajo del gen de ADAM6b de ratón, el gen de ADAM6b de ratón, ~4800 pb de secuencia genómica cadena arriba del gen de ADAM6b de ratón, un sitio Frt 5', un casete de higromicina, un sitio Frt 3', ~300 pb de secuencia genómica de ratón cadena abajo del gen de ADAM6a de ratón, el gen de ADAM6a de ratón, ~3400 pb de secuencia genómica de ratón cadena arriba del gen de ADAM6a de ratón y un fragmento genómico 3' que contiene ~30 kb de secuencia genómica humana 5' del segmento génico V_H6-1 humano (parte inferior de la FIGURA 13).

El clon de BAC modificado por ingeniería genética (descrito anteriormente) se usó para electroporar células ES de ratón que contenían un locus de cadena pesada humanizado para crear células ES modificadas que comprendían una secuencia genómica de ratón situada de forma ectópica que comprende secuencias de ADAM6a y ADAM6b de ratón

en un locus de cadena pesada humanizado. Se identificaron células ES positivas que contenían el fragmento genómico de ratón ectópico en el locus de cadena pesada humanizado mediante un ensayo de PCR cuantitativa usando sondas TAQMAN™ (Lie, Y. S. y Petropoulos, C. J. (1998) Advances in quantitative PCR technology: 5'nuclease assays. Curr Opin Biotechnol 9(1):43-48). Las regiones cadena arriba y cadena abajo fuera de la parte modificada del locus de cadena pesada humanizado se confirmaron mediante PCR usando cebadores y sondas localizados en la región modificada para confirmar la presencia de la secuencia genómica de ratón ectópica en el locus de cadena pesada humanizado así como el casete de higromicina. La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción cadena arriba incluyó lo siguiente, lo que indica secuencia genómica de cadena pesada humana cadena arriba del punto de inserción y un sitio de restricción de I-Ceu I (contenido entre paréntesis a continuación) ligado de forma contigua con secuencia genómica de ratón presente en el punto de inserción: (CCAGCTTCAT TAGTAATCGT TCATCTGTGG TAAAAAGGCA GGATTTGAAG CGATGGAAGA TGGGAGTACG GGGCGTTGGA AGACAAAGTG CCACACAGCG CAGCCTTCGT CTAGACCCCC GGGCTAACTA TAACGGTCTT AAGGTAGCGA G) GGGATGACAG ATTCTCTGTT CAGTGCATC AGGGTCTGCC TCCACGAGAA TCACCATGCC CTTTCTCAAG ACTGTGTTCT GTGCAGTGCC CTGTCAGTGG (SEQ ID NO: 4). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción cadena abajo en el extremo 3' de la región diana incluyó lo siguiente, que indica secuencia genómica de ratón y un sitio de restricción P1-Sce I (contenido entre paréntesis a continuación) ligado de forma continua con secuencia genómica de cadena pesada humana cadena abajo del punto de inserción:

(AGGGGTCGAG GGGGAATTTT ACAAAGAACA AAGAAGCGGG CATCTGCTGA
CATGAGGGCC GAAGTCAGGC TCCAGGCAGC GGGAGCTCCA CCGCGGTGGC
GCCATTTTCAT TACCTCTTTC TCCGCACCCG ACATAGATAAAGCTT) ATCCCCCACC
AAGCAAATCC CCCTACCTGG GGCCGAGCTT CCCGTATGTG GGAAATGAA
TCCCTGAGGT CGATTGCTGC ATGCAATGAA ATTCAACTAG (SEQ ID NO:5).

Se usaron células ES diana descritas anteriormente como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón de estadio de 8 células por el método de ingeniería genética de ratón VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos n.º 7.655.442, 7.576.259, 7.294.754). Se identificaron ratones que portaban un locus de cadena pesada humanizado que contenía una secuencia genómica de ratón ectópica que comprendía secuencias de ADAM6a y ADAM6b de ratón genotificando usando una modificación de ensayo de alelo (Valenzuela *et al.*, 2003) que detectó la presencia de los genes de ADAM6a y ADAM6b de ratón en el locus de cadena pesada humanizado.

Se crían ratones que portan un locus de cadena pesada humanizado que contiene genes de ADAM6a y ADAM6b de ratón con una cepa de ratón con supresión de FLPe (véase, por ejemplo, Rodríguez, C. I. *et al.* (2000) High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. Nature Genetics 25: 139-140) para retirar cualquier casete de higromicina con Frt introducido por el vector de dirección que no esté retirado, por ejemplo, en el estadio de células ES o en el embrión. Opcionalmente, el casete de higromicina se conserva en los ratones.

Las crías se genotifican y se selecciona una cría heterocigota para un locus de cadena pesada humanizado que contiene un fragmento genómico de ratón ectópico que comprende secuencias de ADAM6a y ADAM6b de ratón para caracterizar la expresión génica de ADAM6 y fertilidad de los ratones.

Ejemplo 8. Caracterización de ratones de rescate de ADAM6

Citometría de flujo. Se sacrificaron tres ratones de 25 semanas de edad homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana (H/ κ) y tres ratones de 18-20 semanas de edad homocigotos para cadena pesada humana y ligera κ humana que tenían el fragmento genómico de ratón ectópico que codificaba los genes de ADAM6a y ADAM6b de ratón en ambos alelos del locus de cadena pesada humano (H/ κ -A6) para identificación y análisis de poblaciones de linfocitos mediante FACS en el sistema BD LSR II (BD Bioscience). Los linfocitos se seleccionaron para linajes celulares específicos y se analizaron para determinar la progresión a través de diversos estadios del desarrollo de linfocitos B. Los tejidos recogidos de los animales incluyeron sangre, bazo y médula ósea. Se recogió sangre en tubos microtainer BD con EDTA (BD Biosciences). Se recogió médula ósea de fémures lavando abundantemente con medio RPMI completo complementado con suero de ternero fetal, piruvato sódico, HEPES, 2-mercaptoetanol, aminoácidos no esenciales y gentamicina. Se lisaron glóbulos rojos de preparaciones de sangre, bazo y médula ósea con un tampón de lisis basado en cloruro de amonio (por ejemplo, tampón de lisis de ACK), seguido de lavado con medio RPMI completo.

Para tinción de poblaciones celulares, se incubaron 1×10^6 células de las diversas fuentes tisulares con CD16/CD32 anti ratón (2.4G2, BD Biosciences) en hielo durante 10 minutos, seguido de marcaje con uno o una combinación de los siguientes cócteles de anticuerpos durante 30 minutos en hielo.

Médula ósea: FITC-CD43 anti ratón (1B11, BioLegend), PE-ckit (2B8, BioLegend), PeCy7-IgM (II/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-IgD (11-26c.2a, BioLegend), APC-eFluor780-B220 (RA3-6B2, eBioscience), A700-CD19 (1D3, BD

Biosciences).

Sangre periférica y bazo: FITC- κ anti ratón (187.1, BD Biosciences), PE- λ (RML-42, BioLegend), PeCy7-IgM (II/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-IgD (11-26c.2a, BioLegend), APC-CD3 (145-2C11, BD), A700-CD19 (1D3, BD), APC-eFluor780-B220 (RA3-6B2, eBioscience). Después de la incubación con los anticuerpos marcados, las células se lavaron y se fijaron en formaldehído al 2 %. Se realizó adquisición de datos en un citómetro de flujo LSRII y se analizaron con FlowJo. Se muestran resultados de un ratón H/k y H/k-A6 representativo en las FIGURAS 14-18.

Los resultados demuestran que los linfocitos B de ratones H/k-A6 progresan a través de los estadios del desarrollo de linfocitos B de una manera similar a ratones H/k en la médula ósea y compartimentos periféricos y muestran patrones normales de maduración una vez que entran en la periferia. Los ratones H/k-A6 demostraron una población de células CD43^{int}CD19⁺ aumentada en comparación con ratones H/k (FIGURA 16B). Esto puede indicar una expresión de IgM acelerada desde el locus de cadena pesada humanizado que contiene un fragmento genómico de ratón ectópico que comprende las secuencias de ADAM6a y ADAM6b de ratón en ratones H/k-A6. En la periferia, las poblaciones de linfocitos B y T de ratones H/k-A6 parecen normales y similares a ratones H/k.

Morfología del testículo y caracterización de espermatozoides. Para determinar si la infertilidad en ratones que tienen loci variables de cadena pesada de inmunoglobulina humanizados se debe a defectos del testículo y/o la producción de espermatozoides, se examinó la morfología del testículo y el contenido de espermatozoides en el epidídimo.

Brevemente, se disecaron testículos de dos grupos de cinco ratones por grupo (Grupo 1: ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada y ligera κ humanos, mADAM6^{-/-}; Grupo 2: ratones heterocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humanos y homocigotos para loci de genes variables de cadena ligera κ , mADAM6^{+/-}) con el epidídimo intacto y se pesaron. Después se fijaron las muestras de ensayo, se incluyeron en parafina, se cortaron y se tiñeron con tinción de hematoxilina y eosina (HE). Se examinaron cortes de testículos (2 testículos por ratón, para un total de 20) para determinar defectos en la morfología y pruebas de la producción de espermatozoides, mientras que se examinaron cortes del epidídimo para determinar la presencia de espermatozoides.

En este experimento, no se observó ninguna diferencia en el peso o la morfología de los testículos entre ratones mADAM6^{-/-} y ratones mADAM6^{+/-}. Se observaron espermatozoides en todos los genotipos, tanto en los testículos como en el epidídimo. Estos resultados establecen que la ausencia de genes de ADAM6a y ADAM6b de ratón no conduce a cambios detectables en la morfología del testículo, y que se producen espermatozoides en ratones en presencia y ausencia de estos dos genes. Por lo tanto los defectos en la fertilidad de ratones ADAM6^{-/-} macho probablemente no se deban a baja producción de espermatozoides.

Movilidad y migración de los espermatozoides. Los ratones que carecen de otros miembros de la familia de genes de ADAM son infértiles debido a defectos en la movilidad o migración de espermatozoides. La migración de espermatozoides se define como la capacidad del espermatozoide para pasar del útero al oviducto, y normalmente es necesaria para la fecundación en ratones. Para determinar si la supresión de ADAM6a y ADAM6b de ratón afecta a este proceso, se evaluó la migración de espermatozoides en ratones mADAM6^{-/-}. También se examinó la movilidad de los espermatozoides.

Brevemente, se obtuvieron espermatozoides de testículos de (1) ratones heterocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y homocigotos para loci de genes variables de cadena ligera κ humana (ADAM6^{+/-}); (2) ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y homocigotos para loci de genes variables de cadena ligera κ humana (ADAM6^{-/-}); (3) ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada humana y homocigotos para cadena ligera κ de tipo silvestre (ADAM6^{-/-}mk); y (4) ratones C57 BL/6 de tipo silvestre (TS). No se observó ninguna anomalía significativa en el recuento de espermatozoides o en la movilidad de espermatozoides general mediante inspección. Para todos los ratones, se observó dispersión del cúmulo, lo que indica que cada muestra de espermatozoides fue capaz de penetrar en las células del cúmulo y unirse a la zona pelúcida *in vitro*. Estos resultados establecen que los ratones ADAM6^{-/-} tienen espermatozoides que son capaces de penetrar en el cúmulo y unirse a la zona pelúcida.

La fecundación de óvulos de ratón *in vitro* (FIV) se realizó usando espermatozoides de ratones como se ha descrito anteriormente. Estaba presente un número ligeramente menor de embriones escindidos para ADAM6^{-/-} el día después de la FIV, así como un número reducido de espermatozoides unidos a los óvulos. Estos resultados establecen que los espermatozoides de ratones ADAM6^{-/-}, una vez expuestos a un óvulo, son capaces de penetrar en el cúmulo y unirse a la zona pelúcida.

En otro experimento, la capacidad de los espermatozoides de ratones ADAM6^{-/-} para migrar del útero y a través del oviducto se determinó en un ensayo de migración de espermatozoides.

Brevemente, se preparó un primer grupo de cinco ratones hembra superovuladas con cinco machos ADAM6^{-/-}. Se preparó un segundo grupo de cinco ratones hembra superovuladas con cinco machos ADAM6^{-/-}. Los pares de apareamiento se observaron para determinar la copulación, y de cinco a seis horas después de la copulación se

retiraron el útero y el oviducto unido de todas las hembras y se lavaron para su análisis. Las soluciones de lavado se comprobaron para determinar la presencia de óvulos para verificar la ovulación y obtener un recuento de espermatozoides. Se evaluó la migración de espermatozoides de dos maneras diferentes. En primer lugar, se retiraron ambos oviductos del útero, se lavaron con solución salina y se contó cualquier espermatozoide identificado. También se observó la presencia de óvulos como prueba de ovulación. En segundo lugar, los oviductos se dejaron unidos al útero y ambos tejidos se fijaron, se incluyeron en parafina, se cortaron y se tiñeron (como se ha descrito anteriormente). Las secciones se examinaron para determinar la presencia de espermatozoides, tanto en el útero como en ambos oviductos.

Para las cinco hembras apareadas con los cinco machos ADAM6^{-/-}, se encontraron muy pocos espermatozoides en la solución de lavado del oviducto. Las soluciones de lavado de los oviductos de las cinco hembras apareadas con los cinco machos ADAM6^{+/-} mostraron un nivel de espermatozoides aproximadamente 25 a 30 veces mayor (promedio, n = 10 oviductos) que lo que estaba presente en soluciones de lavado de los oviductos de las cinco hembras apareadas con los cinco machos ADAM6^{-/-}.

Se prepararon cortes histológicos de útero y oviducto. Los cortes se examinaron para determinar la presencia de espermatozoides en el útero y el oviducto (el colículo tubárico). La inspección de cortes histológicos de oviducto y útero reveló que para ratones hembra apareadas con ratones ADAM6^{-/-}, se encontraron espermatozoides en el útero pero no en el oviducto. Además, los cortes de hembras apareadas con ratones ADAM6^{-/-} revelaron que no se encontraban espermatozoides en la unión uterotubal (UTJ). En cortes de hembras apareadas con ratones ADAM6^{+/-}, se identificaron espermatozoides en la UTJ y en el oviducto.

Estos resultados establecen que los ratones que carecen de los genes de ADAM6a y ADAM6b realizan espermatozoides que muestran un defecto de migración *in vivo*. En todos los casos, se observaron espermatozoides en el útero, lo que indica que la copulación y la liberación de espermatozoides se produjeron aparentemente de forma normal, pero se observaron pocos o ningún espermatozoide en los oviductos después de la copulación como se mide mediante recuento de espermatozoides u observación histológica. Estos resultados establecen que los ratones que carecen de genes de ADAM6a y ADAM6b producen espermatozoides que muestran incapacidad para migrar del útero al oviducto. Este defecto conduce aparentemente a infertilidad debido a que los espermatozoides son incapaces de cruzar el punto de unión uterino-tubular al oviducto, donde los óvulos se fertilizan. Tomados en su conjunto, todos estos resultados convergen para apoyar la hipótesis de que los genes de ADAM6 de ratón ayudan a dirigir a los espermatozoides con movilidad normal para que migren fuera del útero, a través de la unión uterotubal y el oviducto, y por tanto se acerquen a un óvulo para conseguir el acontecimiento de fecundación. El mecanismo por el que ADAM6 consigue esto puede ser directamente mediante acción de las proteínas ADAM6, o mediante expresión coordinada con otras proteínas, por ejemplo, otras proteínas ADAM, en la célula espermática, como se describe posteriormente.

Expresión de la familia de genes de ADAM. Se sabe que un complejo de proteínas ADAM está presente como un complejo en la superficie de espermatozoides en maduración. Los ratones que carecen de otros miembros de la familia de genes de ADAM pierden este complejo a medida que maduran los espermatozoides, y muestran una reducción de múltiples proteínas ADAM en espermatozoides maduros. Para determinar si una falta de genes de ADAM6a y ADAM6b afecta a otras proteínas ADAM de una manera similar, se analizaron transferencias de Western de extractos de proteínas de testículo (espermatozoide inmaduro) y epidídimo (espermatozoide en maduración) para determinar los niveles de expresión de otros miembros de la familia de genes de ADAM.

En este experimento, se analizaron extractos de proteínas de cuatro ratones ADAM6^{-/-} y cuatro ADAM6^{+/-}. Los resultados mostraron que la expresión de ADAM2 y ADAM3 no se vio afectada en extractos de testículo. Sin embargo, tanto ADAM2 como ADAM3 se redujeron drásticamente en extractos del epidídimo. Esto demuestra que la ausencia de ADAM6a y ADAM6b en espermatozoides de ratones ADAM6^{-/-} puede tener un efecto directo en la expresión y quizás la función de otras proteínas ADAM a medida que maduran los espermatozoides (por ejemplo, ADAM2 y ADAM3). Esto sugiere que ADAM6a y ADAM6b son parte de un complejo de proteínas ADAM en la superficie del espermatozoide, que podría ser crítico para la migración apropiada de los espermatozoides.

Ejemplo 9. Utilización de genes variables de cadena pesada humana en ratones de rescate ADAM6

El uso de genes variables de cadena pesada humanos seleccionados se determinó para ratones homocigotos para loci de genes variables de cadena pesada y ligera κ humanas que carecen de genes de ADAM6a y ADAM6b de ratón (mADAM6^{-/-}) o que contienen un fragmento genómico ectópico que codifica genes de ADAM6a y ADAM6b de ratón (ADAM6^{+/-}; véase Ejemplo 1) mediante un ensayo de PCR cuantitativa usando sondas TAQMAN™ (como se ha descrito anteriormente).

Brevemente, se purificaron linfocitos B CD19⁺ de los bazo de ratones mADAM6^{-/-} y ADAM6^{+/-} usando microperlas de CD19 de ratón (Miltenyi Biotec) y se purificó ARN total usando el Mini kit RNEASY™ (Qiagen). Se retiró ARN genómico usando un tratamiento en columna de DNasa sin RNasa (Qiagen). Se transcribieron de forma inversa aproximadamente 200 ng de ARNm en ADNc usando un kit de síntesis de ADNc de Primera Cadena (Invitrogen) y después se amplificó con la mezcla maestra de PCR universal TAQMAN™ (Applied Biosystems) usando el sistema de detección de secuencia ABI 7900 (Applied Biosystems). La expresión relativa de cada gen se normalizó con

respecto a la constante κ de ratón (mCk). La Tabla 9 expone las combinaciones de sondas con sentido/antisentido/TAQMAN™ MGB usadas en este experimento.

TABLA 9

V _H Humano	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
V _H 6-1	Con sentido: CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA	6
	Antisentido: GGAGATGGCACAGGTGAGTGA	7
	Sonda: TCCAGGACTGGTGAAGC	8
V _H 1-2	Con sentido: TAGTCCCAGTGATGAGAAAGAGAT	9
	Antisentido: GAGAACACAGAAGTGGATGAGATC	10
	Sonda: TGAGTCCAGTCCAGGGA	11
V _H 3-23	Con sentido: AAAAATTGAGTGTGAATGGATAAGAGTG	12
	Antisentido: AACCTGGTCAGAACTGCCA	13
	Sonda: AGAGAAACAGTGGATACGT	14
V _H 1-69	Con sentido: AACTACGCACAGAAGTTCCAGG	15
	Antisentido: GCTCGTGGATTGTCCGC	16
	Sonda: CAGAGTCACGATTACC	17
mCk	Con sentido: TGAGCAGCACCTCACGTT	18
	Antisentido: GTGGCCTCACAGGTATAGCTGTT	19
	Sonda: ACCAAGGACGAGTATGAA	20

En este experimento, se observó expresión de los cuatro genes de V_H humanos en las muestras analizadas. Además, los niveles de expresión fueron comparables entre ratones mADAM6^{-/-} y ADAM6^{+/+}. Estos resultados demuestran que los genes de V_H humanos que estaban ambos distantes del sitio de modificación (V_H3-23 y V_H1-69) y próximos al sitio de modificación (V_H1-2 y V_H6-1) eran todos capaces de recombinarse para formar una cadena pesada humana expresada funcionalmente. Estos resultados demuestran que el fragmento genómico ectópico que comprende secuencias de ADAM6a y ADAM6b de ratón insertadas en una secuencia genómica de cadena pesada humana no afectó a la recombinación de V(D)J de segmentos génicos de cadena pesada humana en el locus, y estos ratones son capaces de recombinar segmentos génicos de cadena pesada humana de manera normal para producir proteínas de inmunoglobulina de cadena pesada funcionales.

Ejemplo 10. Supresión de los loci de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón

Se realizaron diversas construcciones de dirección usando tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos n.º 6.586.251 y Valenzuela *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, *Nature Biotech.* 21(6): 652-659) para modificar bibliotecas de Cromosomas Artificiales Bacterianos (BAC) genómicas de ratón para inactivar los loci de cadena ligera κ y λ de ratón.

Supresión del locus de cadena ligera λ de ratón. Se modificó ADN del clon de BAC de ratón RP23-135k15 (Invitrogen) mediante recombinación homóloga para inactivar el locus de cadena ligera λ de ratón endógeno a través de supresión dirigida de los grupos de genes de λ 1-J λ -C λ (FIGURA 20).

Brevemente, el grupo próximo completo que comprende los segmentos génicos V λ 1-J λ 3-C λ 3-J λ 1-C λ 1 se suprimió en un único acontecimiento de dirección usando un vector de dirección que comprende un casete de neomicina flanqueado por sitios *loxP* con una rama de homología de ratón 5' que contiene secuencia 5' del segmento génico V λ 1 y una rama de homología de ratón 3' que contiene secuencia 3' del segmento génico C λ 1 (FIGURA 20, Vector de Dirección 1).

Se preparó una segunda construcción de dirección para suprimir con precisión el grupo de genes λ de ratón endógenos distantes que contiene V λ 2-J λ 2-C λ 2-J λ 4-C λ 4 excepto que la construcción de dirección contenía una rama de homología de ratón 5' que contenía la secuencia 5' del segmento génico V λ 2 y una rama de homología de ratón 3' que contenía la secuencia 5' del segmento génico C λ 2 endógeno (FIGURA 20, Vector de Dirección 2). Por tanto, la segunda construcción de dirección suprimió con precisión V λ 2-J λ 2, dejando al mismo tiempo C λ 2-J λ 4-C λ 4 intacto en el locus λ de ratón endógeno. Las células ES que contenían un locus λ endógeno inactivado (como se ha descrito anteriormente) se confirmaron mediante métodos de cariotipificado y exploración (por ejemplo, TAQMAN®) conocidos en la técnica. Después se aisló ADN de las células ES modificadas y se sometió a tratamiento con recombinasa CRE, mediando de este modo en la supresión del casete de dirección próximo que contiene el gen marcador de neomicina, dejando solamente un único sitio *loxP* en el punto de supresión (FIGURA 20, parte inferior).

Supresión del locus de cadena ligera κ de ratón. Se realizaron varias construcciones de dirección usando métodos similares descritos anteriormente para modificar ADN de clones de BAC de ratón RP23-302g12 y RP23-254m04 (Invitrogen) mediante recombinación homóloga para inactivar el locus de cadena ligera κ de ratón en un proceso de dos etapas (FIGURA 21).

Brevemente, los segmentos génicos J κ (1-5) del locus de cadena ligera κ de ratón endógeno se suprimieron en un único acontecimiento de dirección usando un vector de dirección que comprende un casete de higromicina-timidina quinasa (hyg-TK) que contiene un único sitio loxP 3' del casete de hyg-TK (FIGURA 21, Vector de Dirección J κ). Las ramas de homología usadas para realizar este vector de dirección contenían secuencia genómica de ratón 5' y 3' de los segmentos génicos J κ de ratón endógenos. En un segundo acontecimiento de dirección, se preparó un segundo vector de dirección para suprimir una parte de la secuencia genómica de ratón cadena arriba (5') del segmento génico V κ de ratón endógeno más distante (FIGURA 21, Vector de Dirección V κ). Este vector de dirección contenía un sitio lox511 invertido, un sitio loxP y un casete de neomicina. Las ramas de homología usadas para realizar este vector de dirección contenían secuencia genómica de ratón cadena arriba del segmento génico V κ de ratón más distante. Los vectores de dirección se usaron de una manera secuencial (es decir, J κ después V κ) para dirigirse al ADN en células ES. Se confirmaron ES que portaban un cromosoma de diana doble (es decir, un único locus κ de ratón endógeno diana de ambos vectores de dirección) mediante métodos de cariotipificación y exploración (por ejemplo, TAQMAN™) conocidos en la técnica. Se aisló después ADN de las células ES modificadas y se sometió a tratamiento con recombinasa Cre, mediando de este modo en la supresión de segmentos génicos V κ de ratón endógenos y ambos casetes de selección, dejando al mismo tiempo dos sitios lox yuxtapuestos en orientación opuesta uno en relación con el otro (FIGURA 21, parte inferior; SEQ ID NO: 59).

Por tanto, se crearon dos loci de cadena ligera endógenos modificados (κ y λ) que contenían regiones potenciadoras y constantes intactas para insertar progresivamente segmentos génicos de línea germinal λ humanos no reordenados de una manera precisa usando vectores de dirección descritos posteriormente.

Ejemplo 11. Reemplazo de loci de cadena ligera de ratón con un mini-locus de cadena ligera λ humana

Se produjeron por ingeniería genética múltiples vectores de dirección para inserción progresiva de segmentos génicos λ humanos en los loci de cadena ligera κ y λ de ratón endógenos usando métodos similares a los descritos anteriormente. Se realizaron múltiples modificaciones iniciales independientes en los loci de cadena ligera endógenos, que producían cada uno un locus de cadena ligera quimérico que contenía segmentos génicos hV λ y J λ unidos operativamente con genes constantes de cadena ligera de ratón y potenciadores.

Un mini locus λ humano que contiene 12 segmentó génicos Y λ humanos y uno J λ humano. Se prepararon por ingeniería genética una serie de vectores de dirección iniciales para contener los primeros 12 segmentos génicos V λ humanos consecutivos del grupo A y un segmento génico hJ λ 1 o cuatro segmentos génicos hJ λ usando un clon de BAC humano denominado RP11-729g4 (Invitrogen). Las FIGURAS 22A y 22B muestran los vectores de dirección que se construyeron para realizar una inserción inicial de segmentos génicos de cadena ligera λ humanos en los loci de cadena ligera λ y κ de ratón, respectivamente.

Para un primer conjunto de vectores de dirección iniciales, se generó por ingeniería genética un fragmento de ADN de 124125 pb del clon de BAC 729g4 que contenía 12 segmentos génicos hV λ y un segmento génico hJ λ 1 para contener un sitio PI-SceI 996 pb cadena abajo (3') del segmento génico hJ λ 1 para ligamiento de una rama de homología de ratón 3'. Se usaron dos conjuntos diferentes de ramas de homología para ligamiento con este fragmento humano; un conjunto de ramas de homología contenía secuencias λ de ratón endógenas del clon de BAC 135k15 (FIGURA 22A) y otro conjunto contenía la secuencia κ endógena 5' y 3' de los segmentos génicos V κ y J κ de ratón de los clones de BAC de ratón RP23-302g12 y RP23-254m04, respectivamente (FIGURA 22B).

Para el vector de dirección 12/1- λ (FIGURA 22A), se introdujo un sitio de PI-SceI por ingeniería genética en el extremo 5' de un fragmento de ADN de 27.847 pb que contenía el C λ 2-J λ 4-C λ 4 de ratón y potenciador 2.4 del locus λ de ratón modificado descrito en el Ejemplo 10. En el fragmento de ratón de ~28 kb se usó como una rama de homología 3' mediante ligamiento con el fragmento λ humano de ~124 kb, que creó una unión 3' que contenía, de 5' a 3', un segmento génico hJ λ 1, 996 pb de secuencia λ humana 3' del segmento génico hJ λ , 1229 pb de la secuencia λ de ratón 5' del gen de C λ 2 de ratón, el gen de C λ 2 de ratón y la parte restante del fragmento de ratón de ~28 kb. Cadena arriba (5') del segmento génico V λ 3-12 humano tuvo 1456 pb adicionales de secuencia λ humana antes del comienzo de la rama de homología de ratón 5', que contenía 23.792 pb de ADN genómico de ratón correspondiente a la secuencia 5' del locus λ de ratón endógeno. Entre la rama de homología 5' y el comienzo de la secuencia λ humana había un casete de neomicina flanqueado por sitios Frt.

Por tanto, el vector de dirección 12/1- λ incluyó, de 5' a 3', una rama de homología 5' que contenía ~24 kb de secuencia genómica λ de ratón 5' del locus λ endógeno, un sitio Frt 5', un casete de neomicina, un sitio Frt 3', ~123 kb de secuencia λ genómica humana que contenía los primeros 12 segmentos génicos hV λ consecutivos y un segmento génico hJ λ 1, un sitio PI-SceI, y una rama de homología 3' que contenía ~28 kb de secuencia genómica de ratón que incluía los segmentos génicos C λ 2-J λ 4-C λ 4 endógenos, la secuencia potenciadora 2.4 de ratón y secuencia genómica

de ratón adicional cadena abajo (3') del potenciador 2.4 (FIGURA 22A).

De una manera similar, el Vector de Dirección 12/1-κ (FIGURA 22B) empleó el mismo fragmento λ humano de ~124 con la excepción de que se usaron ramas de homología de ratón que contenían secuencia κ de ratón de modo que pudo conseguirse dirección al locus κ endógeno mediante recombinación homóloga. Por tanto, el vector de dirección 12/1-κ incluyó, de 5' a 3', una rama de homología 5' que contenía ~23 kb de secuencia genómica de ratón 5' del locus κ endógeno, un sitio I-Ceul, un sitio Frt 5', un casete de neomicina, un sitio Frt 3', ~124 kb de secuencia λ genómica humana que contenía los primeros 12 segmentos génicos hVλ consecutivos y un segmento génico hJλ1, un sitio PI-SceI, y una rama de homología 3' que contenía ~28 kb de secuencia genómica de ratón que incluía el gen de Cκ de ratón endógeno, Eκ1 y Eκ3' y secuencia genómica de ratón adicional cadena abajo (3') de Eκ3' (FIGURA 22B, Vector de Dirección 12/1-κ).

La recombinación homóloga con uno de estos dos vectores de dirección iniciales creó un locus de cadena ligera de ratón modificado (κ o λ) que contenía 12 segmentos génicos hVλ y un segmento génico hJλ1 unido operativamente con el gen constante de cadena ligera de ratón endógeno y potenciadores (Cκ o Cλ2 y Eκ1/Eκ3' o Enh 2.4/Enh 3.1) que, tras la recombinación conduce a la formación de una cadena ligera λ quimérica.

Un mini locus λ humano con 12 segmentos génicos Vλ humanos y cuatro Jλ humanos. En otro enfoque para añadir diversidad a un locus de cadena ligera λ quimérico, se generó por ingeniería genética un tercer vector de dirección inicial para insertar los 12 primeros segmentos génicos Vλ humanos consecutivos del grupo A y segmentos génicos hJλ1, 2, 3 y 7 en el locus de cadena ligera κ de ratón (FIGURA 22B, Vector de Dirección 12/4-κ). Se realizó un segmento de ADN que contenía segmentos génicos hJλ 1, Jλ2, Jλ3 y Jλ7 mediante síntesis de ADN *de novo* (Integrated DNA Technologies) incluyendo cada segmento génico Jλ y secuencia genómica humana de ~100 pb de las regiones inmediatas tanto 5' como 3' de cada segmento génico Jλ. Se introdujo por ingeniería genética un sitio PI-SceI en el extremo 3' de este fragmento de ADN de ~1 kb y se ligó con un casete de cloranfenicol. Las ramas de homología se amplificaron por PCR a partir de secuencia λ humana en posiciones 5' y 3' en relación con el segmento génico hJλ1 del clon de BAC humano 729g4. Se realizó recombinación homóloga con este vector de dirección intermedio en un clon de BAC 729g4 modificado que se había dirigido previamente cadena arriba (5') del segmento génico vλ3 2 humano con un casete de neomicina flanqueado por sitios Frt, que también contenía un sitio I-Ceul 5' del sitio de Frt 5'. El clon de BAC 729 g4 de doble diana incluyó de 5' a 3' un sitio I-Ceul, un sitio Frt 5', un casete de neomicina, un sitio Frt 3', un fragmento de ~123 kb que contenía los primeros 12 segmentos génicos hVλ, un fragmento de ~1 kb que contenía los segmentos génicos Jλ 1, 2, 3 y 7 humanos, un sitio PI-SceI y un casete de cloranfenicol. Este vector de dirección intermedio se digirió junto con I-Ceul y PI-SceI y posteriormente se ligó en el clon de BAC de ratón modificado (descrito anteriormente) para crear el tercer vector de dirección.

Este ligamiento dio como resultado un tercer vector de dirección para inserción de secuencias λ humanas en el locus de cadena ligera κ endógeno, que incluía, de 5' a 3', una rama de homología de ratón 5' que contenía ~23 kb de secuencia genómica 5' del locus κ de ratón endógeno, un sitio I-Ceul, un sitio Frt 5', un casete de neomicina, un sitio Frt 3', un fragmento de ~123 kb que contenía los primeros 12 segmentos génicos hVλ, un fragmento de ~1 kb que contenía los segmentos génicos hJλ1, 2, 3 y 7, un sitio PI-SceI y una rama de homología 3' que contenía ~28 kb de secuencia genómica de ratón que incluía el gen de Cκ de ratón endógeno, Eκ1 y Eκ3' y secuencia genómica de ratón adicional cadena abajo (3') de Eκ3' (FIGURA 22B, Vector de Dirección 12/4-κ). La recombinación homóloga con este tercer vector de dirección creó un locus de cadena ligera κ de ratón modificado que contenía 12 segmentos génicos hVλ y cuatro segmentos génicos hJλ unidos operativamente con el gen de Cκ de ratón endógeno que, tras la recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera quimérica λ humana/κ de ratón.

Un mini locus λ humano con una secuencia de cadena ligera κ humana integrada. De una manera similar, se generaron por ingeniería genética dos vectores de dirección adicionales similares a los generados por ingeniería genética para realizar una inserción inicial de segmentos génicos λ humanos en el locus de cadena ligera κ endógeno (FIGURA 22B, Vectores de Dirección 12/1-κ y 12/4-κ) para insertar progresivamente segmentos génicos de cadena ligera λ humanos usando vectores de dirección contruidos de forma específica que contienen secuencias genómicas λ y κ humanas contiguas. Estos vectores de dirección se construyeron para incluir una secuencia genómica κ humana de ~23 kb localizada entre los segmentos génicos Vκ4-1 y Jκ1 humanos. Esta secuencia genómica κ humana se situó específicamente en estos dos vectores de dirección adicionales entre los segmentos génicos Vλ humano y Jλ humano (FIGURA 22B, Vectores de Dirección 12(κ)1-κ y 12(κ)4-κ).

Ambos vectores de dirección que contenían la secuencia genómica κ humana se realizaron usando el clon de BAC RP4-729g4 modificado descrito anteriormente (FIGURA 24). Este clon de BAC modificado fue diana de un casete de selección de espectinomicina flanqueado por sitios de restricción NotI y AsiSI (FIGURA 24, parte superior izquierda). La recombinación homóloga con el casete de espectinomicina dio como resultado un clon de BAC de 729g4 de diana doble que incluía, de 5' a 3', un sitio I-Ceul, un sitio Frt 5', un casete de neomicina, un sitio Frt 3', un fragmento de ~123 kb que contenía los primeros 12 segmentos génicos hVλ, un sitio NotI aproximadamente 200 pb cadena abajo (3') de la secuencia noamérica del segmento génico hVλ3-1, un casete de espectinomicina y un sitio AsiSI. Un clon de BAC humano separado que contenía secuencia κ humana (CTD-2366j12) se dirigió dos veces independientemente para modificar sitios de restricción por ingeniería genética en localizaciones entre los segmentos génicos hVκ4-1 y hJκ1 para permitir la clonación posterior de un fragmento de ~23 kb para ligamiento con los segmentos génicos hVλ

contenidos en el clon de BAC 729g4 modificado de doble diana (FIGURA 24, parte superior derecha).

Brevemente, el clon de BAC 2366j12 tiene un tamaño de aproximadamente 132 kb y contiene los segmentos génicos hVκ 1-6, 1-5, 2-4, 7-3, 5-2, 4-1, secuencia genómica humana κ humana cadena debajo de los segmentos génicos Vκ, segmentos génicos hJκ 1-5, el Cκ y aproximadamente 20 kb de secuencia genómica adicional del locus κ humano. Este clon fue primero diana de un vector de dirección que contenía un casete de higromicina flanqueado por sitios Frt y un sitio NotI cadena abajo (3') del sitio de Frt 3'. Las ramas de homología para este vector de dirección contenían secuencia genómica humana 5' y 3' de los segmentos génicos Vκ en el clon de BAC de modo que tras la recombinación homóloga con este vector de dirección, los segmentos génicos Vκ se suprimieron y se generó por ingeniería genética un sitio NotI ~133 pb cadena abajo del segmento génico hVκ4-1 (FIGURA 24, parte superior derecha). Este clon de BAC 2366j12 fue diana de forma independiente de dos vectores de dirección en el extremo 3' para suprimir los segmentos génicos hJκ con un casete de cloranfenicol que también contenía un segmento génico hJλ1, un sitio PI-SceI y un sitio AsiSI o un fragmento genómico λ humano que contenía cuatro segmentos génicos hJλ (mencionado anteriormente), un sitio PI-SceI y un sitio AsiSI (FIGURA 24, parte superior derecha). Las ramas de homología para estos dos vectores de dirección similares contenían secuencias 5' y 3' de los segmentos génicos hJκ. La recombinación homóloga con estos segundos vectores de dirección y el clon de BAC 2366j12 modificado produjo un clon de 2366j12 de doble diana que incluía, de 5' a 3', un sitio Frt 5', un casete de higromicina, un sitio Frt 3', un sitio NotI, un fragmento genómico de 22.800 pb del locus κ humano que contenía la región intergénica entre los segmentos génicos Vκ4-1 y Jκ1, un segmento génico hJλ1 o un fragmento genómico λ humano que contenía hJλ1, Jλ2, Jλ3 y Jλ7, un sitio PI-SceI y un casete de cloranfenicol (FIGURA 24, parte superior derecha). Se obtuvieron dos vectores de dirección finales para realizar las dos modificaciones adicionales mediante dos etapas de ligamiento usando los clones 729g4 y 2366j12 de doble diana.

Se digirieron clones 729g4 y 2366j12 de doble diana con NotI y AsiSI, produciendo un fragmento que contenía el casete de neomicina y segmentos génicos hVλ y otro fragmento que contenía el fragmento genómico de ~23 kb del locus κ humano que contenía la región intergénica entre los segmentos génicos Vκ4-1 y Jκ1, un segmento génico hJλ1 o un fragmento genómico que contenía los segmentos génicos hJλ1, Jλ2, Jλ3 y Jλ7, el sitio PI-SceI y el casete de cloranfenicol, respectivamente. El ligamiento de estos fragmentos generó dos clones de BAC únicos que contenían de 5' a 3' los segmentos génicos hVλ, la secuencia genómica κ humana entre los segmentos génicos Vκ4-1 y Jκ1, un segmento génico hJλ1 o un fragmento genómico que contenía los segmentos génicos hJλ1, Jλ2, Jλ3 y Jλ7, un sitio PI-SceI y un casete de cloranfenicol (FIGURA 24, parte inferior). Estos nuevos clones de BAC se digirieron después con I-CeuI y PI-SceI para liberar los fragmentos únicos que contenían el casete de neomicina cadena arriba y las secuencias λ y κ humanas contiguas y se ligaron en un clon de BAC de ratón modificado 302g12 que contenía de 5' a 3' secuencia genómica de ratón 5' del locus κ endógeno, un sitio I-CeuI, un sitio Frt 5', un casete de neomicina, un sitio Frt 3', segmentos génicos hVλ (de 3-12 a 3-1), un sitio NotI ~200 pb cadena abajo de Vλ3-1, ~23 kb de secuencia κ humana hallada de forma natural entre los segmentos génicos Vκ4-1 y Jκ1 humanos, un segmento génico hJλ1 o un fragmento genómico que contenía los segmentos génicos hJλ1, Jλ2, Jλ3 y Jλ7, el Eki de ratón, el gen de Cκ de ratón y Ek3' (FIGURA 22, Vectores de Dirección 12hVλ-VκJκ-hJλ1 y 12hVλ-VκJκ-4hJλ). La recombinación homóloga con ambos de estos vectores de dirección creó dos loci de cadena ligera κ de ratón modificados separados que contenían 12 segmentos génicos hVλ, secuencia genómica κ humana y uno o cuatro segmentos génicos hJλ unidos operativamente con el gen de Cκ de ratón endógeno que, tras la recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera quimérica λ humana/κ de ratón.

Ejemplo 12. Introducción por ingeniería genética de segmentos génicos Yλ humanos adicionales en un mini locus de cadena ligera λ humano

Se añadieron segmentos génicos hVλ adicionales independientemente de cada una de las modificaciones iniciales descritas en el Ejemplo 11 usando vectores de dirección y métodos similares (FIGURA 23A, Vector de Dirección +16-λ y FIGURA 23B, Vector de Dirección +16-κ).

Introducción de 16 segmentos génicos Yλ humanos adicionales. Las ramas de homología cadena arriba (5') usadas en la construcción de vectores de dirección para añadir 16 segmentos génicos hVλ adicionales a los loci de cadena ligera modificados descritos en el Ejemplo 11 contenían secuencia genómica de ratón 5' de los loci de cadena ligera κ o λ endógenos. Las ramas de homología 3' fueron iguales para todos los vectores de dirección y contenían secuencia genómica humana solapante con el extremo 5' de la secuencia λ humana de las modificaciones como se describen en el Ejemplo 11.

Brevemente, se generaron por ingeniería genética dos vectores de dirección para la introducción de 16 segmentos génicos hVλ adicionales en los loci de cadena ligera de ratón modificados descritos en el Ejemplo 11 (FIGURA 23A y 5B, Vectores de Dirección +16-λ o +16-κ). Se generó por ingeniería genética un fragmento de ADN de ~172 kb a partir del clon de BAC humano RP11-761113 (Invitrogen) que contenía 21 segmentos génicos hVλ consecutivos del grupo A con una rama de homología 5' que contenía secuencia genómica de ratón 5' de los loci de cadena ligera κ o λ endógenos y una rama de homología 3' que contenía secuencia λ genómica humana. Las ramas de homología κ o λ de ratón 5' usadas en estas construcciones de dirección fueron las mismas ramas de homología 5' descritas en el Ejemplo 11 (FIGURA 23A y 23B). La rama de homología 3' incluía un solapamiento de 53.057 pb de secuencia λ genómica humana correspondiente al extremo 5' equivalente del fragmento de ~123 kb de secuencia λ genómica

humana descrita en el Ejemplo 11. Estos dos vectores de dirección incluían, de 5' a 3', una rama de homología de ratón 5' que contenía ~23 kb de secuencia genómica 5' del locus de cadena ligera κ de ratón endógeno o ~24 kb de secuencia genómica de ratón 5' del locus de cadena ligera λ endógeno, un sitio Frt 5', un casete de higromicina, un sitio Frt 3' y 171.457 pb de secuencia λ genómica humana que contenía 21 segmentos génicos hV λ consecutivos, ~53 kb de los cuales solapan con el extremo 5' de la secuencia λ humana descrita en el Ejemplo 12 y actúa como la rama de homología 3' para esta construcción de dirección (FIGURA 23A y 23B, Vectores de Dirección +16- λ o +16- κ). La recombinación homóloga con estos vectores de dirección creó de forma independiente loci de cadena ligera κ y λ de ratón modificados que contenían cada uno 28 segmentos génicos hV λ y un segmento génico hJ λ 1 unidos operativamente con genes constantes de ratón endógenos (C κ o C λ 2) que, tras la recombinación, conducen a la formación de una cadena ligera quimérica.

De una manera similar, el vector de dirección +16- κ también se usó para introducir los 16 segmentos génicos hV λ adicionales en las otras modificaciones iniciales descritas en el Ejemplo 11 que incorporaban múltiples segmentos génicos hJ λ con y sin una secuencia κ humana integrada (FIGURA 22B). La recombinación homóloga con este vector de dirección en el locus κ de ratón endógeno que contenía las otras modificaciones iniciales creó loci de cadena ligera κ de ratón que contenían 28 segmentos génicos hV λ y segmentos génicos hJ λ 1, 2, 3 y 7 con y sin una secuencia genómica V κ -J κ humana unida operativamente con el gen de C κ de ratón endógeno que, tras la recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera λ - κ quimérica.

Introducción de 12 segmentos génicos V λ humanos adicionales. Se añadieron segmentos génicos hV λ adicionales de forma independiente a cada una de las modificaciones descritas anteriormente usando vectores y métodos de dirección similares. La estructura de locus final resultante de recombinación homóloga con vectores de dirección que contenían segmentos génicos hV λ adicionales se muestra en la FIGURA 25A y 25B.

Brevemente, se generó por ingeniería genética un vector de dirección para introducción de 12 segmentos génicos hV λ adicionales en los loci de cadena ligera κ y λ de ratón modificados descritos anteriormente (FIGURA 23A y 23B, vectores de dirección +12- λ o 12- κ). Se generó por ingeniería genética un fragmento de ADN de 93.674 pb del clon de BAC humano RP11-22118 (Invitrogen) que contenía 12 segmentos génicos hV λ consecutivos del grupo B con una rama de homología 5' que contenía secuencia genómica de ratón 5' de los loci de cadena ligera κ o λ de ratón endógenos y una rama de homología 3' que contenía secuencia λ genómica humana. Las ramas de homología 5' usadas en esta construcción de dirección fueron las mismas ramas de homología 5' usadas para la adición de 16 segmentos génicos hV λ descritos anteriormente (FIGURA 23A y 23B). La rama de homología 3' se realizó introduciendo por ingeniería genética un sitio de PI-SceI de ~3431 pb 5' del segmento génico V λ 3-29P humano contenido en un fragmento genómico de 27.468 pb de secuencia λ humana del clon de BAC RP11-761113. Este sitio PI-SceI actuó como un punto de ligamiento para unir el fragmento de ~94 kb de secuencia λ humana adicional con el fragmento de ~27 kb de secuencia λ humana que solapa con el extremo 5' de la secuencia λ humana en la modificación previa usando los Vectores de Dirección +16- λ o +16- κ (FIGURA 23A y 23B). Estos dos vectores de dirección incluían, de 5' a 3', una rama de homología 5' que contenía ~23 kb de secuencia genómica de ratón 5' del locus de cadena ligera κ endógeno o ~24 kb de secuencia genómica de ratón 5' del locus de cadena ligera λ endógeno, un sitio Frt 5', un casete de neomicina, un sitio Frt 3' y 121.188 pb de secuencia λ genómica humana que contenía 16 segmentos génicos hV λ y un sitio PI-SceI, ~27 kb del cual solapan con el extremo 5' de la secuencia λ humana de la inserción de 16 segmentos génicos hV λ de adición y actúa como la rama de homología 3' para esta construcción de dirección (FIGURA 23A y 23B, Vectores de Dirección +12- λ o 12- κ). La recombinación homóloga con estos vectores de dirección creó de forma independiente loci de cadena ligera κ y λ de ratón modificados que contenían 40 segmentos génicos hV λ y J λ 1 humano unido operativamente con los genes constantes de ratón endógenos (C κ o C λ 2) que, tras la recombinación, conducen a la formación de una cadena ligera quimérica (parte inferior de la FIGURA 23A y 23B).

De una manera similar, el vector de dirección +12- κ también se usó para introducir los 12 segmentos génicos hV λ adicionales en las otras modificaciones iniciales que incorporaban múltiples segmentos génicos hJ λ con y sin una secuencia κ humana integrada (FIGURA 22B). La recombinación homóloga con este vector de dirección en el locus κ de ratón endógeno que contenía las otras modificaciones creó un locus de cadena ligera κ de ratón que contenía 40 segmentos génicos hV λ y segmentos génicos hJ λ 1, 2, 3 y 7 con y sin una secuencia genómica V κ -J κ humana unida operativamente con el gen de C κ de ratón endógeno que, tras la recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera λ - κ quimérica.

Ejemplo 13. Identificación de células ES diana que portan segmentos génicos de cadena ligera λ humanos

Se usó ADN de BAC diana realizado según los ejemplos anteriores para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas para generar ratones quiméricos que expresan segmentos génicos de cadena ligera λ humanos. Se identificaron células ES que contenían una inserción de segmentos génicos de cadena ligera λ humanos no reordenados mediante un ensayo de TAQMAN® cuantitativo. Se diseñaron conjuntos de cebadores y sondas específicos para inserción de secuencias λ humanas y casetes de selección asociados (ganancia de alelo, GOA), pérdida de secuencias de ratón endógenas y cualquier casete de selección (pérdida de alelo, LOA) y retención de secuencias de ratón flanqueantes (retención de alelos, RA). Para cada inserción adicional de secuencias λ humanas, se usaron conjuntos de cebadores y sondas adicionales para confirmar la presencia de las secuencias λ humanas adicionales así como los conjuntos de cebadores y sondas previos usados para confirmar la retención de las secuencias humanas que han sido diana previamente. La Tabla 10 expone los cebadores y sondas asociadas usados en los ensayos de PCR cuantitativa. La Tabla 11 expone las combinaciones usadas para confirmar la inserción de cada sección de segmentos génicos de cadena ligera λ humanos en clones de células ES.

Se transfectan opcionalmente células ES que portan los segmentos génicos de cadena ligera λ humanos con una construcción que expresa FLP para retirar el casete de neomicina con Frt introducido por la inserción de la construcción de dirección que contiene segmentos génicos V λ 5-52 - V λ 1-40 humanos (FIGURA 23A y 23B). El casete de neomicina puede retirarse opcionalmente criando con ratones que expresan FLP recombinasa (por ejemplo, documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina se conserva en los ratones.

TABLA 10

Cebador	SEQ ID NO:	Sonda	SEQ ID NO:
hL2F	60	hL2P	82
hL2R	61		
hL3F	62	hL3P	83
hL3R	63		
NeoF	64	NeoP	84
NeoR	65		
61hJ1F	66	61hJ1P	85
61hJ1R	67		
67hT1F	68	67hT1P	86
67hT1R	69		
67hT3F	70	67hT3P	87
67hT3R	71		
HygF	72	HygP	88
HygR	73		
MKD2F	74	MKD2P	89
MKD2R	75		
MKP8F	76	MKP8P	90
MKP8R	77		
MKP15F	78	MKP15P	91
MKP15R	79		
MK20F	80	-	-
MKP4R	81		
68h2F	92	68h2P	96
68h2R	93		
68h5F	94	68h5P	97

Cebador	SEQ ID NO:	Sonda	SEQ ID NO:
68h5R	95		
mL1F	133	mL1P	141
mL1R	134		
mL2F	135	mL2P	142
mL2R	136		
mL11F	137	mL11P	143
mL11R	138		
mL12F	139	mL12P	144
mL12R	140		

TABLA 11

Modificación	Ensayo	Conjunto de Cebadores Directos/Inversos	Sonda	Localización de Secuencia
Inserción de 12 hVλ y hJλ1	GOA	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12 - hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		61hJ1F/61hJ1R	61hJ1P	Secuencia de hJλ
		NeoF/NeoR	NeoP	Casete de neomicina
	LOA	MK20F/MKP4R	-	Secuencia de lox511/loxP de locus κ inactivado
		HygF/HygR	HygP	Casete de higromicina de locus λ inactivado
		mL1 F/mL1R	ml1P	Grupo de Vλ1-Cλ1 de ratón
		mL2F/mL2R	ml2P	
		mL11F/mL11R	ml11P	Grupo de Vλ2-Cλ2 de ratón
		mL12F/mL12R	ml12P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Secuencia de ratón en locus Vκ 5'
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Secuencia de ratón en locus Vκ 3'
Inserción de 16 hVλ	GOA	67hT1 F/67hT1R	67hT1 P	hVλ3-27 - hVλ3-12
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	
		HygF/HygR	HygP	Casete de higromicina
	LOA	NeoF/NeoR	NeoP	Casete de neomicina
		mL1 F/mL1R	ml1 P	Grupo de Vλ1-Cλ1 de ratón
		mL2F/mL2R	ml2P	
		mL11F/mL11R	ml11P	Grupo de Vλ2-Cλ2 de ratón
		mL12F/mL12R	ml12P	
	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12 - hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Secuencia de ratón en locus Vκ 5'
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Secuencia de ratón en locus Vκ 3'
		68h2F/68h2R	68h2P	hVλ5-52 - hVλ1-40

Modificación	Ensayo	Conjunto de Cebadores Directos/Inversos	Sonda	Localización de Secuencia
Inserción de 12 hVλ	GOA	68h5F/68h5R	68h5P	
		NeoF/NeoR	NeoP	Casete de neomicina
	LOA	HygF/HygR	HygP	Casete de higromicina
		mL1F/mL1R	ml1 P	Grupo de Vλ1-Cλ1 de ratón
		mL2F/mL2R	ml2P	
		mL11F/mL1R	ml11P	Grupo de Vλ2-Cλ2 de ratón
		mL12F/mL12R	ml12P	
	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12 - hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		67hT1 F/67hT1R	67hT1P	hVλ3-27 - hVλ 3-12
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Secuencia de ratón en locus Vκ 5'
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Secuencia de ratón en locus Vκ 3'

Ejemplo 14. Generación de ratones que expresan cadena ligera λ humana a partir de un locus de cadena ligera endógeno

- 5 Se usaron células ES diana descritas anteriormente como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón de estadio de 8 células por el método de VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos n.º 7.294.754 y Poueymirou *et al.* (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1): 91-99). Se identificaron VELOCIMICE® (ratones F0 procedentes totalmente de la célula ES donante) que portaban de forma independiente
- 10 segmentos génicos λ humanos por genotipificación usando una modificación de ensayo de alelos (Valenzuela *et al.*, mencionado anteriormente) que detectaba la presencia de los segmentos génicos λ humanos únicos (mencionado anteriormente).

15 **Uso de cadena ligera κ:λ de ratones que portan segmentos génicos de cadena ligera λ humanos.** Se analizaron ratones homocigotos para cada una de las tres inserciones sucesivas de segmentos génicos hVλ con un único segmento génico hJλ (FIGURA 23B) y ratones homocigotos para una primera inserción de segmentos génicos hVλ con un único segmento génico hJλ o cuatro segmentos génicos Jλ humanos que incluían una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (FIGURA 22B) para determinar la expresión de cadena ligera κ y λ en esplenocitos usando citometría de flujo.

20 Brevemente, se recogieron bazo de grupos de ratones (que variaban de tres a siete animales por grupo) y se molieron usando portaobjetos de vidrio. Después de la lisis de glóbulos rojos (RBC) con tampón de lisis ACK (Lonza Walkersville), se tiñeron esplenocitos con anticuerpos conjugados con colorantes fluorescentes específicos para CD19 de ratón (Clon 1D3; BD Biosciences), CD3 de ratón (17A2; Biolegend), Igκ de ratón (187.1; BD Biosciences) e Igλ de ratón (RML-42; Biolegend). Se adquirieron datos usando un citómetro de flujo BD™ LSR II (BD Biosciences) y se analizaron usando software FLOWJO™ (Tree Star, Inc.). La Tabla 12 expone el porcentaje promedio de valores para expresión de linfocitos B (CD19⁺), cadena ligera κ (CD19⁺Igκ⁺Igλ⁻) y cadena ligera λ (CD19⁺Igκ⁺Igλ⁺) observada en esplenocitos de grupos de animales que portan cada modificación genética.

30 En un experimento similar, se analizaron los contenidos de linfocitos B del compartimento esplénico de ratones homocigotos para una primera inserción de 12 segmentos génicos hVλ y cuatro hJλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana unida operativamente con el gen de Cκ de ratón (parte inferior de la FIGURA 22B) y ratones homocigotos para 40 segmentos génicos hVλ y un hJλ (parte inferior de la FIGURA 23B o parte superior de la FIGURA 25B) para determinar la expresión de Igκ e Igλ usando citometría de flujo (como se ha descrito anteriormente). La FIGURA 26A muestra la expresión de Igλ e Igκ en linfocitos B CD19⁺ para un ratón representativo de cada grupo. El número de linfocitos B CD19⁺ por bazo también se registró para cada ratón (FIGURA 26B).

40 En otro experimento, se analizaron los contenidos de linfocitos B de los compartimentos de bazo y médula ósea de ratones homocigotos para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro hJλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana unida operativamente con el gen de Cκ de ratón (parte inferior de la FIGURA 26B) para determinar la progresión a través del desarrollo de linfocitos B usando citometría de flujo de diversos marcadores de superficie celular. Brevemente, se sacrificaron dos grupos (N = 3 cada uno, 9-12 semanas de edad, machos y hembras) de ratones de

tipo silvestre y homocigotos para 40 segmentos génicos hV λ y cuatro hJ λ que incluían una secuencia genómica V κ -J κ humana unida operativamente con el gen de C κ de ratón y se recogieron los bazos y la médula ósea. La médula ósea se recogió de fémures lavando con medio RPMI completo (medio RPMI complementado con suero de ternero fetal, piruvato sódico, Hepes, 2-mercaptoetanol, aminoácidos no esenciales y gentamicina). Se lisaron los RBC de preparaciones de bazo y médula ósea con tampón de lisis ACK (Lonza Walkersville), seguido de lavado con medio RPMI completo. Se incubaron 1x10⁶ células con anti CD16/CD32 de ratón (2.4G2, BD Biosciences) en hielo durante 10 minutos, seguido de marcaje con un panel de anticuerpos seleccionado durante 30 minutos en hielo.

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

Panel de médula ósea y bazo: anti Ig κ de ratón-FITC (187.1, BD), PE-Ig λ , (RML-42, BioLegend), PeCy7-IgM (II/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-IgD (11-26c.2a, BioLegend), Pacific Blue-CD3 (17A2, BioLegend), APC-B220 (RA3-6B2, eBioscience), APC-H7-CD19 (ID3, BD).

Después de la tinción, las células se lavaron y se fijaron en formaldehído al 2 %. Se realizó adquisición de datos en un citómetro de flujo FACSCANTOII™ (BD Biosciences) y se analizó con software FLOWJO™ (Tree Star, Inc.). Las FIGURAS 27A-27D muestran los resultados para el compartimento esplénico de un ratón representativo de cada grupo. Las FIGURAS 28A-28E muestran los resultados para el compartimento de médula ósea de un ratón representativo de cada grupo. La Tabla 13 expone los valores de porcentaje promedio para expresión de linfocitos B (CD19⁺), cadena ligera κ (CD19⁺Ig κ ⁺Ig λ ⁺) y cadena ligera λ (CD19⁺Ig κ ⁺Ig λ ⁺) observada en esplenocitos de grupos de animales que portan diversas modificaciones genéticas. La Tabla 14 expone los valores de porcentaje promedio para linfocitos B (CD19⁺), linfocitos B maduros (B220^{alt}IgM⁺), linfocitos B inmaduros (B220^{int}IgM⁺), linfocitos B inmaduros que expresan cadena ligera κ (B220^{int}IgM⁺Ig κ ⁺) y linfocitos B inmaduros que expresan cadena ligera λ (B220^{int}IgM⁺Ig λ ⁺) observados en médula ósea de ratones de tipo silvestre y homocigotos para 40 segmentos génicos hV λ y cuatro hJ λ que incluían una secuencia genómica V κ -J κ humana unida operativamente con el gen de C κ de ratón. Este experimento se repitió con grupos adicionales de los ratones descritos anteriormente y demostró resultados similares (datos no mostrados)

TABLA 12

Genotipo	Linfocitos B Ig κ ⁺ Ig λ ⁺		
Tipo Silvestre	46,2	91,0	3,6
12 hV λ +hJ λ 1	28,3	10,4	62,5
12 hV λ -V κ J κ -hJ λ 1	12,0	11,0	67,5
12 hV λ -V κ J κ -4hJ λ	41,8	17,2	68,4
28 hV λ +hJ λ 1	22,0	13,3	51,1
40 hV λ +hJ λ 1	28,2	24,3	53,0

TABLA 13

Genotipo	Linfocitos B Ig κ ⁺ Ig λ ⁺		
Tipo Silvestre	49,8	91,2	3,5
40 hV λ -V κ J κ -4hJ λ	33,3	41,6	43,1

TABLE 14

Genotipo	Linfocitos B	Linfocitos B maduros	Linfocitos B inmaduros	Linfocitos B Ig κ ⁺ inmaduros	Linfocitos B Ig λ ⁺ inmaduros
Tipo Silvestre	62,2	9,2	12,0	79,0	8,84
40hV λ -V κ J κ -4hJ λ	60,43	2,59	7,69	38,29	43,29

Uso de genes de V λ humanos en ratones que portan segmentos génicos de cadena ligera λ humanos. Se analizaron ratones heterocigotos para una primera inserción de secuencias λ humanas (hV λ 3-12 - hV λ 3-1 y hJ λ 1, FIGURA 23B) y homocigotos para una tercera inserción de secuencias λ humanas (hV λ 5-52 - hV λ 3-1 y hJ λ 1, FIGURA 23B) para determinar el uso de genes de cadena ligera λ humanos mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) usando ARN aislado de esplenocitos.

Brevemente, se recogieron bazos y se perfundieron con 10 ml de RPMI-1640 (Sigma) con HI-FBS 5 % en bolsas

desechables estériles. Cada bolsa que contenía un único bazo se colocó después en un STOMACHER™ (Seward) y se homogeneizó a un ajuste medio de 30 segundos. Los bazos homogeneizados se filtraron usando un tamiz celular de 0,7 µm y después se sedimentaron con una centrifuga (1000 rpm durante 10 minutos) y se lisaron los RBC en BD PHARM LYSE™ (BD Biosciences) durante tres minutos. Los esplenocitos se diluyeron con RPMI-1640 y se centrifugaron de nuevo, seguido de resuspensión en 1 ml de PBS (Irvine Scientific). Se aisló ARN de esplenocitos sedimentados usando técnicas convencionales conocidas en este campo.

Se realizó RT-PCR en ARN de esplenocitos usando cebadores específicos para segmentos génicos hVλ humanos y el gen de Cκ de ratón (Tabla 15). Los productos de PCR se purificaron en gel y se clonaron en vector pCR2.1-TOPO TA (Invitrogen) y se secuenciaron con cebadores M13 Directo (GTAAAACGAC GGCCAG; SEQ ID NO: 113) y M13 Inverso (CAGGAAACAG CTATGAC; SEQ ID NO: 114) localizados en el vector en localizaciones que flanquean el sitio de clonación. Se secuenciaron ochenta y cuatro clones totales procedentes de la primera y tercera inserciones de secuencias λ humanas para determinar el uso de genes de hVλ (Tabla 16). La secuencia de nucleótidos de la unión de hVλ-hJλ1-mCκ para clones de RT-PCR seleccionados se muestra en la FIGURA 29.

De una manera similar, se analizaron ratones homocigotos para una tercera inserción de secuencias de genes de cadena ligera λ humanos (es decir 40 segmentos génicos hVλ y cuatro segmentos génicos hJλ que incluían una secuencia genómica Vk-Jk humana, parte inferior de la FIGURA 25B) unidas operativamente con el gen de Cκ de ratón endógeno para determinar el uso de genes de cadena ligera λ humana mediante RT-PCR usando ARN aislado de esplenocitos (como se ha descrito anteriormente). El uso de segmentos génicos de cadena ligera λ humanos para 26 clones de RT-PCR seleccionados se muestra en la Tabla 17. La secuencia de nucleótidos de la unión de hVλ-hJλ-mCκ para clones de RT-PCR seleccionados se muestra en la FIGURA 30.

De una manera similar, se analizaron ratones homocigotos para una primera inserción de segmentos génicos de cadena ligera λ humanos (12 segmentos génicos hVλ y hJλ1, FIGURA 22A y FIGURA 23A) unidos operativamente con el gen de Cλ2 de ratón endógeno para determinar el uso de genes de cadena ligera λ humanos mediante RT-PCR usando ARN aislado de esplenocitos (como se ha descrito anteriormente). Los cebadores específicos para segmentos génicos hVλ (Tabla 15) se emparejaron con uno de dos cebadores específicos para el gen de Cλ2 de ratón; Cλ2-1 (SEQ ID NO: 162) o Cλ2-2 (SEQ ID NO: 163).

Se observaron múltiples segmentos génicos hVλ reordenados a hJλ1 de los clones de RT-PCR de ratones que portaban segmentos génicos de cadena ligera λ humanos en el locus de cadena ligera λ de ratón endógeno. La secuencia de nucleótidos de la unión de hVλ-hJλ-mCλ2 para clones de RT-PCR seleccionados se muestra en la FIGURA 31.

TABLA 15

Cebador de hVλ 5'	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
VLL-1	CCTCTCCTCC TCACCCTCCT	98
VLL-1n	ATGRCCDGST YYYCTCTCCT	99
VLL-2	CTCCTCACTC AGGGCACA	100
VLL-2n	ATGGCCTGGG CTCTGCTSCT	101
VLL-3	ATGGCCTGGA YCSCTCTCC	102
VLL-4	TCACCATGGC YTGGRYCYCM YTC	103
VLL-4.3	TCACCATGGC CTGGGTCTCC TT	104
VLL-5	TCACCATGGC CTGGAMTCYT CT	105
VLL-6	TCACCATGGC CTGGGCTCCA CTACTT	106
VLL-7	TCACCATGGC CTGGACTCCT	107
VLL-8	TCACCATGGC CTGGATGATG CTT	108
VLL-9	TAAATATGGC CTGGGCTCCT CT	109
VLL-10	TCACCATGCC CTGGGCTCTG CT	110
VLL-11	TCACCATGGC CTGACTCCT CT	111
Cebador de Cκ de ratón 3'	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
mIgKC3'-1	CCCAAGCTTA CTGGATGGTG GGAAGATGGA	112

TABLA 16

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

TABLA 17

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

Clon	hV λ	hJ λ
7a-2	9-49	2
7a-7	3-10	7
7b-2	7-43	3
7b-7	7-46	7
7b-8	7-43	3
11a-1	5-45	2
11a-2	5-45	7

La FIGURA 29 muestra la secuencia de la unión de hV λ -hJ λ 1-mC κ para clones de RT-PCR de ratones que portan una primera y tercera inserción de segmentos génicos hV λ con un único segmento génico hJ λ . Las secuencias mostradas en la FIGURA 29 ilustran reordenaciones únicas que implican diferentes segmentos génicos hV λ con hJ λ 1 recombinado con el gen de C κ de ratón. Los ratones heterocigotos que portan un único locus κ endógeno modificado que contiene 12 segmentos génicos hV λ y hJ λ 1 y ratones homocigotos que portan dos loci κ endógenos modificados que contienen 40 segmentos génicos hV λ y hJ λ 1 fueron ambos capaces de producir segmentos génicos λ humanos unidos operativamente con el gen de C κ de ratón y producir linfocitos B que expresaban cadenas ligeras λ humanas. Estos reordenamientos demuestran que los loci quiméricos fueron capaces de reordenar de forma independiente segmentos génicos λ humanos en múltiples linfocitos B independientes en estos ratones. Además, estas modificaciones del locus de cadena ligera κ endógeno no hicieron a ninguno de los segmentos génicos hV λ inoperativos ni evitaron que el locus quimérico recombinara múltiples hV λ y un segmento génico hJ λ (J λ 1) durante el desarrollo de linfocitos B como se demuestra por 16 segmentos génicos hV λ diferentes que se observó que se reordenaban con hJ λ 1 (Tabla 16). Además, estos ratones realizaron anticuerpos funcionales que contenían segmentos génicos V λ -J λ humanos reordenados unidos operativamente con genes de C κ de ratón como parte del repertorio de cadenas ligeras de inmunoglobulina endógenas.

La FIGURA 30 muestra la secuencia de la unión hV λ -hJ λ -mC κ para clones de RT-PCR seleccionados de ratones homocigotos para 40 segmentos génicos hV λ y cuatro hJ λ que incluían una secuencia genómica V κ -J κ humana. Las secuencias mostradas en la FIGURA 30 ilustran reordenaciones únicas adicionales que implican múltiples segmentos génicos hV λ diferentes, que abarcan el locus quimérico completo, con múltiples segmentos génicos hJ λ diferentes reordenados y unidos operativamente con el gen de C κ de ratón. Los ratones homocigotos que portaban loci κ endógenos modificados que contenían 40 segmentos génicos hV λ y cuatro hJ λ también fueron capaces de producir segmentos génicos λ humanos unidos operativamente con el gen de C κ de ratón y producir linfocitos B que expresaban cadenas ligeras λ humanas. Estos reordenamientos demuestran además que todos los estadios de loci quiméricos fueron capaces de reordenar de forma independiente segmentos génicos λ humanos en múltiples linfocitos B independientes en estos ratones. Además, estas modificaciones adicionales del locus de cadena ligera κ endógeno demuestran que cada inserción de segmentos génicos λ humanos no hizo a ninguno de los segmentos génicos hV λ y/o J λ inutilizables o evitó que el locus quimérico se recombinara con los segmentos génicos hV λ y J λ durante el desarrollo de linfocitos B como se demuestra por 12 segmentos génicos hV λ diferentes que se observó que se reordenaban con los cuatro segmentos génicos hJ λ (Tabla 17) de los 26 clones de RT-PCR seleccionados. Además, estos ratones también realizaron anticuerpos funcionales que contenían segmentos génicos V λ -J λ humanos unidos operativamente con regiones C κ de ratón como parte del repertorio de cadenas ligeras de inmunoglobulina endógenas.

La FIGURA 31 muestra la secuencia de la unión hV λ -hJ λ -mC λ 2 para tres clones de RT-PCR individuales de ratones homocigotos para 12 segmentos génicos hV λ y hJ λ 1. Las secuencias mostradas en la FIGURA 31 ilustran reordenamientos únicos adicionales que implican diferentes segmentos génicos hV λ , que abarcan la longitud de la primera inserción, con hJ λ 1 reordenado y unido operativamente con el gen de C λ 2 de ratón (2D1 = V λ 2-8J λ 1; 2D9 = V λ 3-10J λ 1; 3E15 = V λ 3-1J λ 1). Un clon demostró un reordenamiento no productivo debido a adiciones de N en la unión hV λ -hJ λ (2D1, FIGURA 31). Esto no es habitual en la recombinación de V(D)J, ya que se ha mostrado que la unión de segmentos génicos durante la recombinación es imprecisa. Aunque este clon representa un recombinante no productivo presente en el repertorio de cadenas ligeras de estos ratones, esto demuestra que el mecanismo genético que contribuye a la diversidad de uniones entre genes de anticuerpos está operativo de forma normal en estos ratones y conduce a un repertorio de anticuerpos que contiene cadenas ligeras con mayor diversidad.

Los ratones homocigotos que portaban loci λ endógenos modificados que contenían 12 segmentos génicos hV λ y hJ λ 1 también fueron capaces de producir segmentos génicos λ humanos unidos operativamente con un gen de C λ de ratón endógeno y producir linfocitos B que expresaban cadenas ligeras λ quiméricas inversas que contenían regiones hV λ ligadas a regiones C λ de ratón. Estos reordenamientos demuestran adicionalmente que los segmentos génicos de cadena ligera λ humanos en el otro locus de cadena ligera (es decir, el locus λ) eran capaces de reordenar de forma independiente segmentos génicos λ humanos en múltiples linfocitos B independientes en estos ratones. Además, las modificaciones del locus de cadena ligera λ endógeno demuestran que la inserción de segmentos génicos

λ humanos no hizo a ninguno de los segmentos génicos hV λ y/o hJ λ 1 inutilizable o evitó que el locus quimérico se recombine con los segmentos génicos hV λ y hJ λ 1 durante el desarrollo de linfocitos B. Además, estos ratones también realizaron anticuerpos funcionales que contenían segmentos génicos V λ -J λ humanos unidos operativamente con una región C λ de ratón como parte del repertorio de cadenas ligeras de inmunoglobulina endógenas.

Como se muestra en este Ejemplo, los ratones que portan segmentos génicos de cadena ligera λ humanos en los loci de cadena ligera κ y λ endógenos son capaces de reordenar segmentos génicos de cadena ligera λ humanos y expresarlos en el contexto de una región C κ y/o C λ de ratón como parte del repertorio de anticuerpos normal del ratón debido a que es necesaria una cadena ligera funcional en diversos puntos de control en el desarrollo de linfocitos B tanto en el bazo como en la médula ósea. Además, subconjuntos tempranos de linfocitos B (por ejemplo, pre, pro y linfocitos B transicionales) demuestran un fenotipo normal en estos ratones en comparación con compañeros de camada de tipo silvestre (FIGURAS 27D, 28A y 28B). Se observó un déficit pequeño en poblaciones de linfocitos B de médula ósea y periféricas, que puede atribuirse a una supresión de un subconjunto de linfocitos B inmaduros autorreactivos y/o una asociación subóptima de cadena ligera λ humana con cadena pesada de ratón. Sin embargo, el uso de Ig κ /Ig λ observado en estos ratones demuestra una situación que es más como la expresión de cadena ligera humana que la observada en ratones.

Ejemplo 15. Cría de ratones que expresan cadenas ligeras λ humanas a partir de un locus de cadena ligera endógeno

Para optimizar el uso de los segmentos génicos λ humanos en un locus de cadena ligera de ratón endógeno, se crían ratones que portan los segmentos génicos λ humanos no reordenados con otro ratón que contiene una supresión en el locus de cadena ligera endógeno opuesto (κ o λ). Por ejemplo, los segmentos génicos λ humanos situados en el locus κ endógeno serían los únicos segmentos génicos de cadena ligera funcionales presentes en un ratón que también portara una supresión en el locus de cadena ligera λ endógeno. De esta manera, la descendencia obtenida expresaría solamente cadenas ligeras λ como se ha descrito en los ejemplos anteriores. La cría se realiza por técnicas convencionales reconocidas en este campo y, como alternativa, por compañías comerciales, por ejemplo, The Jackson Laboratory. Las cepas de ratón que portan segmentos génicos de cadena ligera λ humanos en el locus κ endógeno y una supresión del locus de cadena ligera λ endógeno se exploran para determinar la presencia de cadenas ligeras λ únicas inversas-quiméricas (humanas-de ratón) y ausencia de cadenas ligeras λ de ratón endógenas.

También se crían ratones que portan un locus de cadena ligera λ humano no reordenado con ratones que contienen un reemplazo del locus de gen variable de cadena pesada de ratón endógeno con el locus de gen variable de cadena pesada humano (véase documento US 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals, el ratón modificado por ingeniería genética VELOCIMMUNE®). El ratón VELOCIMMUNE® incluye, en parte, tener un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada humanas unidas operativamente con loci de región constante de ratón de modo que el ratón produzca anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada humana y una región constante de cadena pesada de ratón en respuesta a estimulación antigénica. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas de los anticuerpos puede aislarse y unirse operativamente con ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada humana. El ADN puede expresarse después en una célula capaz de expresar la cadena pesada completamente humana del anticuerpo. Tras un programa de cría adecuado, se obtienen ratones que portan un reemplazo del locus de cadena pesada de ratón endógeno con el locus de cadena pesada humano y un locus de cadena ligera λ humano no reordenado en el locus de cadena ligera κ endógeno. Pueden aislarse anticuerpos que contienen regiones variables de cadena pesada humanas mutadas de forma somática y regiones variables de cadena ligera λ humanas tras inmunización con un antígeno de interés.

Ejemplo 16. Generación de anticuerpos de ratones que expresan cadenas pesadas humanas y cadenas ligeras λ humanas

Después de criar ratones que contienen el locus de cadena ligera λ humano no reordenado con diversas cepas deseables que contienen modificaciones y supresiones de otros loci Ig endógenos (como se ha descrito anteriormente), los ratones seleccionados se inmunizan con un antígeno de interés.

En general, un ratón VELOCIMMUNE® que contiene una de las regiones de cadena ligera de línea germinal humanas reordenadas individuales se expone a un antígeno, y se recuperan células linfáticas (tales como linfocitos B) del suero de los animales. Las células linfáticas pueden fusionarse con una línea celular de mieloma para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales, y dichas líneas celulares de hibridoma se exploran y seleccionan para identificar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos que contienen cadena pesada humana y cadena ligera λ humana que son específicas para el antígeno usado para inmunización. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras λ puede aislarse y ligarse a regiones constantes isotópicas deseables de la cadena pesada y cadena ligera. Debido a la presencia de los segmentos génicos hV λ adicionales en comparación con el locus λ de ratón endógeno, la diversidad del repertorio de cadenas ligeras aumenta drásticamente y confiere mayor diversidad al repertorio específico de antígeno tras la inmunización. Las secuencias de anticuerpos clonados resultantes pueden producirse posteriormente en una célula, tal como una célula CHO. Como alternativa, puede aislarse ADN que codifica los anticuerpos quiméricos específicos de antígeno o los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas directamente de linfocitos específicos de antígeno (por ejemplo, linfocitos B).

Inicialmente, se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos se caracterizan y seleccionan para determinar características deseables, incluyendo afinidad, selectividad, epítomos, etc. Las regiones constantes de ratón se reemplazan con una región constante humana deseada para generar el anticuerpo completamente humano que contiene una cadena pesada humana mutada de forma somática y una cadena ligera λ humana procedente de un locus de cadena ligera λ humano no reordenado de la invención. Las regiones constantes humanas adecuadas incluyen, por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 de tipo silvestre o modificadas.

Ejemplo 17. Cría de ratones ADAM6 y ratones con variable λ humana

Cualquiera de los ratones descritos en el presente documento que comprenda una modificación de un gen de ADAM6 endógeno u ortólogo u homólogo del mismo, y comprende además un gen que confiera función de ADAM6 al ratón, se cría con un ratón que comprende una modificación que comprende un segmento variable λ humano (por ejemplo, un segmento V y J) unido operativamente con un gen constante λ o κ humano o de ratón. El ratón que comprende el segmento variable λ humano puede tener el segmento variable presente en un locus λ o κ endógeno modificado, o en un transgén. Los ratones se crían y la descendencia se cruza adicionalmente, si es necesario, y la descendencia se explora para determinar ratones fértiles que muestran la función de ADAM6 y que también expresan la secuencia λ humana en el contexto de una región constante λ o κ humana o de ratón, según corresponda.

Un ratón que comprende un locus variable de cadena pesada humanizado (segmentos V, D y J humanos que reemplazan todos o sustancialmente todos los segmentos V, D y J de ratón) que comprende además una secuencia de ADAM6 ectópica (o una secuencia de un ortólogo u homólogo de ADAM6 que confiere función de ADAM6 al ratón) se cría con un ratón que comprende un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos V y J de cadena ligera con segmento V y J de cadena ligera λ humana en el locus λ de ratón y/o el locus κ de ratón. La descendencia se cría adicionalmente según sea necesario, y se identifican ratones que expresan un anticuerpo que comprende un V_H humano fusionado con una secuencia constante de cadena pesada, y un V_L λ humano aún fusionado con una secuencia constante de cadena ligera λ o κ .

Los ratones se exponen a un antígeno de interés y se permite que generen una respuesta inmunitaria. Se identifican anticuerpos específicos para el antígeno de interés y se identifican secuencias V_H humanas y secuencias variables λ humanas (incluyendo secuencias variables λ humanas ligadas a regiones constantes κ de ratón) y se emplean para realizar un anticuerpo humano modificando por ingeniería genética las secuencias de dominio variable en combinación con genes de región constante humanos.

En un caso, se crea un ratón por cría que comprende un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos V, D y J de cadena pesada de ratón con segmentos V, D y J humanos en el locus de cadena pesada de ratón endógeno y que comprende un alelo de cadena ligera que comprende un reemplazo de todas o sustancialmente todas las secuencias variables de cadena ligera λ con una o más secuencias variables λ humanas en un locus λ de ratón endógeno unido operativamente a una secuencia constante λ , y que comprende un alelo de cadena ligera que comprende un reemplazo de todas o sustancialmente todas las secuencias variables de cadena ligera κ en un locus κ endógeno con una o más secuencias variables λ humanas. El animal se expone a un antígeno de interés y se permite que monte una respuesta inmunitaria. Se identifican anticuerpos que se unen con el antígeno de interés que comprenden dominios variables de cadena pesada humanos afines con dominios variables λ humanos en una región constante λ de ratón o κ de ratón. Se emplean secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios variables para realizar un anticuerpo completamente humano modificando por ingeniería genética las secuencias variables en combinación con secuencias de región constante humanas.

Los ratones descritos en este ejemplo comprenden una o más regiones intergénicas V_k - J_k descritas en el texto y las figuras del presente documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> Ratones con cadenas ligeras humanizadas

<130> 1390A-WO

<150> 61/578.097

<151> 20-12-2011

<160> 163

<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

5

<210> 1

<211> 754

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

10

<400> 1

```

Met Leu Ser Leu Thr Trp Gly Met Arg Leu Val Glu Arg Pro Val Val
 1           5           10           15
Pro Arg Val Leu Leu Leu Leu Phe Ala Leu Trp Leu Leu Leu Leu Val
          20           25           30
Pro Val Trp Cys Ser Gln Gly His Pro Thr Trp Arg Tyr Ile Ser Ser
          35           40           45
Glu Val Val Ile Pro Arg Lys Glu Ile Tyr His Thr Lys Gly Leu Gln
 50           55           60
Ala Gln Arg Leu Leu Ser Tyr Ser Leu Arg Phe Arg Gly Gln Arg His
65           70           75           80
Ile Ile His Leu Arg Arg Lys Thr Leu Ile Trp Pro Arg His Leu Leu
          85           90           95
Leu Thr Thr Gln Asp Asp Gln Gly Ala Leu Gln Met Glu Tyr Pro Phe
          100          105          110
Phe Pro Val Asp Cys Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Glu Gly Ile Leu Gln
          115          120          125
Ser Met Val Thr Val Asp Thr Cys Tyr Gly Gly Leu Ser Gly Val Ile
          130          135          140
Lys Leu Asp Asn Leu Thr Tyr Glu Ile Lys Pro Leu Asn Asp Ser Gln
145           150           155           160
Ser Phe Glu His Leu Val Ser Gln Ile Val Ser Glu Ser Asp Asp Thr
          165          170          175
Gly Pro Met Asn Ala Trp Lys His Trp Ser His Asn Thr Gly Ser Pro
          180          185          190
Ser Ser Arg Leu Glu Tyr Ala Asp Gly Ala Pro Arg Leu Ser Ser Lys
          195          200          205
Asn Tyr Ala Thr His Pro Ala Ala Ile Lys Gly His Phe Gln Ala Thr
210           215           220
His Ser Val Tyr Ser Ala Ser Gly Gly Asp Lys Leu Ser Ser Thr Val
225           230           235           240
Glu Tyr Leu Phe Lys Val Ile Ser Leu Met Asp Thr Tyr Leu Thr Asn
          245          250          255
Leu His Met Arg Tyr Tyr Val Phe Leu Met Thr Val Tyr Thr Glu Ala
          260          265          270

```

ES 2 720 186 T3

Asp	Pro	Phe	Ser	Gln	Asp	Phe	Arg	Val	Pro	Gly	Gly	Gln	Ala	His	Thr		
		275					280					285					
Phe	Tyr	Glu	Arg	Val	Phe	Tyr	Ala	His	Phe	Arg	Pro	Asp	Ala	Gly	Ala		
	290					295					300						
Ile	Ile	Asn	Lys	Asn	Ser	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Val	Asn	Pro	Ala	Glu		
305					310					315					320		
Arg	Ser	Ile	Cys	Ser	Pro	Ser	Ala	Leu	Ile	Cys	Leu	Gly	Gln	His	Gly		
			325						330					335			
Arg	Asn	Pro	Leu	Phe	Leu	Ser	Ile	Ile	Ile	Thr	Asn	Arg	Val	Gly	Arg		
			340					345					350				
Ser	Leu	Gly	Leu	Lys	His	Asp	Glu	Gly	Tyr	Cys	Ile	Cys	Gln	Arg	Arg		
		355					360					365					
Asn	Thr	Cys	Ile	Met	Phe	Lys	Asn	Pro	Gln	Leu	Thr	Asp	Ala	Phe	Ser		
	370					375					380						
Asn	Cys	Ser	Leu	Ala	Glu	Ile	Ser	Asn	Ile	Leu	Asn	Thr	Pro	Asp	Leu		
385					390					395					400		
Met	Pro	Cys	Leu	Phe	Tyr	Asp	Arg	His	Val	Tyr	Tyr	Asn	Thr	Ser	Leu		
			405						410					415			
Thr	Tyr	Lys	Phe	Cys	Gly	Asn	Phe	Lys	Val	Asp	Asn	Asn	Glu	Gln	Cys		
			420					425					430				
Asp	Cys	Gly	Ser	Gln	Lys	Ala	Cys	Tyr	Ser	Asp	Pro	Cys	Cys	Gly	Asn		
		435					440					445					
Asp	Cys	Arg	Leu	Thr	Pro	Gly	Ser	Ile	Cys	Asp	Lys	Glu	Leu	Cys	Cys		
	450					455					460						
Ala	Asn	Cys	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ser	Gly	Thr	Leu	Cys	Arg	Pro	Ile	Gln		
465					470					475				480			
Asn	Ile	Cys	Asp	Leu	Pro	Glu	Tyr	Cys	Ser	Gly	Ser	Lys	Phe	Ile	Cys		
			485						490					495			
Pro	Asp	Asp	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asp	Gly	Thr	Pro	Cys	Ser	Glu	Glu	Gly		
			500					505					510				
Tyr	Cys	Tyr	Lys	Gly	Asn	Cys	Thr	Asp	Arg	Asn	Ile	Gln	Cys	Met	Glu		
		515					520					525					
Ile	Phe	Gly	Val	Ser	Ala	Lys	Asn	Ala	Asn	Ile	Lys	Cys	Tyr	Asp	Ile		
	530					535					540						
Asn	Lys	Gln	Arg	Phe	Arg	Phe	Gly	His	Cys	Thr	Arg	Ala	Glu	Glu	Ser		
545					550					555					560		
Leu	Thr	Phe	Asn	Ala	Cys	Ala	Asp	Gln	Asp	Lys	Leu	Cys	Gly	Arg	Leu		
			565						570					575			
Gln	Cys	Thr	Asn	Val	Thr	Asn	Leu	Pro	Phe	Leu	Gln	Glu	His	Val	Ser		
			580					585					590				
Phe	His	Gln	Ser	Val	Ile	Ser	Gly	Val	Thr	Cys	Phe	Gly	Leu	Asp	Glu		
		595					600					605					
His	Arg	Gly	Thr	Glu	Thr	Ala	Asp	Ala	Gly	Leu	Val	Arg	His	Gly	Thr		
	610					615					620						
Pro	Cys	Ser	Arg	Gly	Lys	Phe	Cys	Asp	Arg	Gly	Ala	Cys	Asn	Gly	Ser		
625					630					635				640			
Leu	Ser	Arg	Leu	Gly	Tyr	Asp	Cys	Thr	Pro	Glu	Lys	Cys	Asn	Phe	Arg		
			645						650					655			
Gly	Val	Cys	Asn	Asn	Arg	Arg	Asn	Cys	His	Cys	His	Phe	Gly	Trp	Ser		
			660					665					670				
Pro	Pro	Lys	Cys	Lys	Glu	Glu	Gly	His	Ser	Gly	Ser	Ile	Asp	Ser	Gly		
		675					680					685					
Ser	Pro	Pro	Val	Gln	Arg	Arg	Ile	Ile	Lys	Gln	Asn	Leu	Glu	Pro	Val		
		690				695					700						
Val	Tyr	Leu	Arg	Ile	Leu	Phe	Gly	Arg	Ile	Tyr	Phe	Leu	Phe	Val	Ala		
705					710					715				720			
Leu	Leu	Phe	Gly	Ile	Ala	Thr	Arg	Val	Gly	Val	Thr	Lys	Ile	Phe	Arg		
			725						730					735			
Phe	Glu	Asp	Leu	Gln	Ala	Ala	Leu	Arg	Ser	Trp	Gln	Glu	Gln	Ala	Lys		
			740					745					750				

Asp Lys

5
<210> 2
<211> 756
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 2

ES 2 720 186 T3

Met	Leu	Ser	Leu	Thr	Trp	Gly	Met	Arg	Leu	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Val
1				5					10					15	
Pro	Arg	Val	Leu	Leu	Leu	Phe	Ala	Leu	Trp	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	
			20				25						30		
Pro	Val	Trp	Cys	Ser	Gln	Gly	His	Pro	Thr	Trp	Arg	Tyr	Ile	Ser	Ser
		35					40					45			
Glu	Val	Val	Ile	Pro	Arg	Lys	Glu	Ile	Tyr	His	Thr	Lys	Gly	Leu	Gln
	50					55					60				
Ala	Gln	Arg	Leu	Leu	Ser	Tyr	Ser	Leu	His	Phe	Arg	Gly	Gln	Arg	His
65					70					75					80
Ile	Ile	His	Leu	Arg	Arg	Lys	Thr	Leu	Ile	Trp	Pro	Arg	His	Leu	Leu
			85						90					95	
Leu	Thr	Thr	Gln	Asp	Asp	Gln	Gly	Ala	Leu	Gln	Met	Asp	Tyr	Pro	Phe
			100					105					110		
Phe	Pro	Val	Asp	Cys	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Tyr	Leu	Glu	Gly	Ile	Pro	Gln
		115					120					125			
Ser	Met	Val	Thr	Val	Asp	Thr	Cys	Tyr	Gly	Gly	Leu	Ser	Gly	Val	Met
	130					135					140				
Lys	Leu	Asp	Asp	Leu	Thr	Tyr	Glu	Ile	Lys	Pro	Leu	Asn	Asp	Ser	Gln
145					150					155					160
Ser	Phe	Glu	His	Leu	Val	Ser	Gln	Ile	Val	Ser	Glu	Ser	Asp	Asp	Thr
			165						170					175	
Gly	Pro	Met	Asn	Ala	Trp	Lys	His	Trp	Ser	His	Asn	Thr	Gly	Ser	Pro
			180					185					190		
Ser	Ser	Arg	Leu	Glu	Tyr	Ala	Asp	Gly	Ala	Pro	Arg	Ile	Ser	Ser	Lys
		195					200					205			
Asn	Tyr	Ala	Thr	His	Pro	Ala	Ala	Ile	Lys	Gly	His	Phe	Gln	Ala	Thr
	210					215					220				
Asn	Ser	Val	Tyr	Asn	Ser	Ala	Ala	Gly	Asp	Lys	Leu	Ser	Ser	Thr	Val
225					230					235					240
Gly	Tyr	Leu	Phe	Gln	Val	Ile	Ser	Leu	Met	Asp	Thr	Tyr	Leu	Thr	Asn
			245						250					255	
Leu	His	Met	Arg	Tyr	Tyr	Val	Phe	Leu	Met	Thr	Val	Tyr	Thr	Asn	Ser
			260					265					270		
Asp	Pro	Phe	Arg	Leu	Glu	Phe	Ala	Val	Pro	Gly	Gly	Ser	Ala	Tyr	Asn
		275					280					285			
Tyr	Tyr	Val	Ser	Val	Phe	Tyr	Asn	Lys	Phe	Lys	Pro	Asp	Ala	Gly	Val
	290					295					300				
Leu	Leu	Asn	Lys	Tyr	Gly	Pro	Gln	Asp	Asn	Gln	Val	Asn	Pro	Ala	Glu
305					310					315					320
Arg	Ser	Ile	Cys	Ser	Ser	Leu	Ala	Leu	Ile	Cys	Ile	Gly	Lys	Tyr	Asp
			325						330					335	
Arg	Asn	Pro	Leu	Phe	Leu	Ser	Pro	Ile	Ile	Thr	Asn	Arg	Val	Gly	Arg
			340					345					350		
Ser	Leu	Gly	Leu	Lys	Tyr	Asp	Glu	Gly	Tyr	Cys	Val	Cys	Gln	Arg	Arg
		355					360					365			
Asn	Thr	Cys	Ile	Met	Phe	Arg	His	Pro	Gln	Leu	Thr	Asp	Ala	Phe	Ser
	370					375					380				
Asn	Cys	Ser	Leu	Ala	Glu	Ile	Ser	Asn	Ile	Leu	Asn	Thr	Pro	Gly	Leu
385					390					395					400

ES 2 720 186 T3

Met	Pro	Cys	Leu	Phe	Tyr	Asp	Arg	His	Val	Tyr	Tyr	Asn	Thr	Ser	Leu	
				405					410						415	
Thr	Tyr	Lys	Phe	Cys	Gly	Asn	Phe	Lys	Val	Asp	Asn	Asp	Glu	Gln	Cys	
			420					425					430			
Asp	Cys	Gly	Ser	Gln	Lys	Ala	Cys	Tyr	Ser	Asp	Pro	Cys	Cys	Gly	Asn	
		435					440					445				
Asp	Cys	Arg	Leu	Thr	Pro	Gly	Ser	Ile	Cys	Asp	Lys	Glu	Leu	Cys	Cys	
	450					455					460					
Ala	Asn	Cys	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ser	Gly	Thr	Leu	Cys	Arg	Pro	Ile	Gln	
465					470					475					480	
Asn	Ile	Cys	Asp	Leu	Pro	Glu	Tyr	Cys	Asn	Gly	Thr	Lys	Tyr	Ile	Cys	
				485					490					495		
Pro	Asp	Asp	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asp	Gly	Thr	Pro	Cys	Ser	Glu	Asp	Gly	
			500					505					510			
Tyr	Cys	Tyr	Lys	Gly	Asn	Cys	Thr	Asp	Arg	Asn	Ile	Gln	Cys	Met	Glu	
		515					520					525				
Ile	Phe	Gly	Val	Ser	Ala	Lys	Asn	Ala	Asn	Ile	Lys	Cys	Tyr	Asp	Ile	
	530					535					540					
Asn	Lys	Gln	Arg	Phe	Arg	Phe	Gly	His	Cys	Thr	Arg	Ala	Glu	Glu	Ser	
545					550					555					560	
Leu	Thr	Phe	Asn	Ala	Cys	Ala	Asp	Gln	Asp	Lys	Leu	Cys	Gly	Arg	Leu	
				565					570					575		
Gln	Cys	Thr	Asn	Val	Thr	Asn	Leu	Pro	Tyr	Leu	Gln	Glu	His	Val	Ser	
			580					585					590			
Phe	His	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Gly	Phe	Thr	Cys	Phe	Gly	Leu	Asp	Glu	
		595					600					605				
His	Arg	Gly	Thr	Glu	Thr	Thr	Asp	Ala	Gly	Met	Val	Arg	His	Gly	Thr	
	610					615					620					
Pro	Cys	Ser	Lys	Ser	Lys	Phe	Cys	Asp	Gln	Gly	Ala	Cys	Ser	Gly	Ser	
625					630					635					640	
Leu	Ser	His	Leu	Gly	Tyr	Asp	Cys	Thr	Pro	Glu	Lys	Cys	Ser	Phe	Arg	
				645					650					655		
Gly	Val	Cys	Asn	Asn	His	Arg	Asn	Cys	His	Cys	His	Phe	Gly	Trp	Lys	
			660					665					670			
Pro	Pro	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu	Gly	Leu	Ser	Gly	Ser	Ile	Asp	Ser	Gly	
		675					680					685				
Ser	Pro	Pro	Val	Gln	Arg	His	Thr	Ile	Lys	Gln	Lys	Gln	Glu	Pro	Val	
	690					695					700					
Val	Tyr	Leu	Arg	Ile	Leu	Phe	Gly	Arg	Ile	Tyr	Phe	Leu	Phe	Val	Ala	
705					710					715					720	
Leu	Leu	Phe	Gly	Ile	Ala	Thr	Arg	Val	Gly	Val	Thr	Lys	Ile	Phe	Arg	
				725					730					735		
Phe	Glu	Asp	Leu	Gln	Ala	Thr	Leu	Arg	Ser	Gly	Gln	Gly	Pro	Ala	Arg	
			740					745					750			
Asp	Lys	Pro	Lys													
			755													

<210> 3
 <211> 13894
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 3

ES 2 720 186 T3

```
gtcctaaggt agcgagggat gacagattct ctgttcagtg cactcaggggt ctgcctccac 60
gagaatcacc atgccctttc tcaagactgt gttctgtgca gtgccctgtc agtggaatc 120
tggagagcat gcttccatga gcttgtgagt agtatatcta gtaagccatg gctttgtgtt 180
```

```

aatgggtgatg ttctacatac cagttctctcg gcttaataat gaggtgatga ttctatgttc 240
ctgtaacgct tcctcaactg ggtcctaagt ctttcttcac tccatctatt cctctaagga 300
atgatcctga aaatcccatc acaaactata ggagatggga accatcaaaa aacacagtga 360
caaagaggtg ggaacgcac cagggttcagg aaccatattt taaaaagata tcgtaaataa 420
cttcttaaaa gagatataga caaatctcca ttaatacggg gaccagaggc ctaaggctaa 480
gaaccaatgg tggctcaagg tctcctgcta ccgaggagagc aaacgtagag cagtttctaa 540
tgattttattt aaaatataga atcaaaaagta ccagtttgca attttgaaag atttatttca 600
gcaatgcaac aacatcaggc ggtgccgagt ccaacacgct ttatgtccca tgatataaac 660
aaaggccatc cagaactgtg gactggagtt ctacctgtgc ccctaattgac attcagattt 720
tttttccatt ctctttatct tagaggagac aggggggctaa ctcattttac ttgtcctttg 780
cttggttcttg ccaagaacgc aaagcagcct gcaagtcttc aaacctaaat atcttagtaa 840
ctctacacg agtggcaatg ccaaagagca gtgcaacaaa gaggaagtaa atacgaccaa 900
agagtattct taaatacact actggctcta ggttctgttt tattatgcgc ctttgaaccg 960
gaggggaccc actgtctatg ctcccactgt gtccctcttc tttgcacttt ggagggtccc 1020
aaccaaaatg gcaatggcaa ttccgacgat tgttacacac tccctctgaaa ttgcattttt 1080
ctgggggtgca gtcataaccc aaacgagata aacttccatt gcaagctcct cgatcacaga 1140
acttaccctt tgaacacggg gtacctgtgc tcaccaatcc agcatctgct gtttctgtcc 1200
cacgatgttc atcaagccca aagcaggtaa cccagagat aaccgattga tggaatgaaa 1260
catgttcttg caaaaatgga agattgggtga cattgggtaca ctgcaacctt ccacacagct 1320
tgtcctgatc agcacaagca ttgaatgtga ggctttcttc tgctctagta caatgcccaa 1380
atcgaaaccg ttgtttgttg atgtcatagc acttaatat agcattctta gcacttacac 1440
caaagatttc catgcattgt atgttgcat cagtgcagtt acctttatag cagtaacctt 1500
cttctgagca tgggtgccca tcttgcatgt aagtgtcatc tgggcaaatt aacttagagc 1560
cactacagta ctctggaaga tcacatatgt tctggatagg tclgcagagt gtcccagaag 1620
gactgtaagt gcaatttgca cagcataatt ctttatcaca aatgtacca ggtgttaacc 1680
tgcaatcatt tccacagcag gcatctgaat aacatgcctt ttgggagcca cagtcacact 1740
gctcattgtt atctactttg aagtttccac aaaacttata agtcaatgat gtattataat 1800
aaacatgacg gtcatagaaa agacatggca tcagatcagg agtattaagt atgttgctta 1860
tctctgcaag ggaacaattg ctgaaagcat ctgttaattg aggatttttg aacatgatgc 1920
aggtgttctt tctctggcag atacagtacc cctcatcatg ttttaggcct aaactccttc 1980
caacacgatt ggttattata atagataaaa ataaaggatt tcgaccatgt tgaccaagac 2040
aaattagggc tgagggagaa catatactcc tctcagctgg attaacagca tcactctctg 2100
gcgaattctt gttaattata gctcctgcat caggcctaaa atgagcataa aatactctct 2160
catagaaaat atgagcctgc cctcctggaa ctcgaaaatc ttgtgaaaat ggatcagcct 2220
cggatatacac agtcatgaga aagacatagt accgcataat aagattgggtc agataggtgt 2280
ccattaaact aatgacitla aacaaatact caacagttaga tgaaagtgtg tcacctccag 2340
aagcactata tacagaatgg gttgcttgaa agtggccttt tatagcagct ggaatgtgag 2400
cgtaattctt actagatagt ctgggagctc catctgcata ttccaatctg gaggaggag 2460
aacctgtatt atggctccag tgcttccatg cattcatagg cctgtgtgca tcagactcag 2520
atactatctg agaaacaagg tgttcaaagc tctgtgaatc attgaggggt ttgatttcat 2580
aggtaaggtt atccaacttt atgacccttg acaggccccc ataacaagta tccacagtga 2640
ccatggattg caggatcccc tcaggttagc caatatagta acaatctaca ggaaaaaagg 2700
ggtactccat ctgtaaggct ccttggtcat cttgagttgt cagcaacaag tgtctgggcc 2760
aaatgagtgt ctttctccgc aggtggatga tatgtctctg gccccgaaa cgcaagctat 2820
acgagagcag tctttgtgct tgaagtccct tggatgggtg gatctccttc cgaggaataa 2880
ccacctccga tgagatgtaa cgccaagtgg gatggccttg agaaccaccag actggaacca 2940
ggaggagcag ccagagtgca aatagcaaga ggaggacctt ggggaccaca ggtctttcca 3000
ctagcctcat gcccaggtc agagataaca tctgggtgg agctaactcc ctctgctgtg 3060
gccactgcct ggtctagaaa atactgacag aggaactaaa acctcctcag gctcccaacc 3120
taagtggtta cccagacaac tggagttagg taacagtcac tgggtgtggc aggaattgag 3180
tctgaatgtg ttagctgagg ttgagggtta atattgtcaa aagggatgtc tataaatgtg 3240
cctggacaag aaaagtccga agcagcaagg agtgtctctg acaggctcaa tcttttcttt 3300
tctttttttg aagttcaaaa tatcatttcc acgtgaatgt atttggttcc cagtgtgact 3360
ctgggtctct ttctaggagt caatatctct ttatatcttg gctcatgttt ttcacagttg 3420
ttctaacttc ttgttttgtt ctgtttgttt gtttggttga aagttagaag taaatactgt 3480
ctatattagc cttttagcta taaatgattg tttttatttc ttctaatacat gttttgtttg 3540
agttttggtt aaactattta caaatgagtt ttttttttcc ttttgggtgt tgctcgaaag 3600
tttgagcctt tctgttaata ttgtgttgtt gtttctccaa tattattaga cctgagaatt 3660
ctacctgggt acctgtgaac tccagaattt ttaaaaaatt catctcttgg gaacattatc 3720
tctgaccccg tctgaggccg aagtggctgt cccctccaa ccttttagtat ctttctttcc 3780

```

tgactattgg	gattttcttca	agcaatcagg	ctgatggggtt	ctcagcagtg	agaccagtag	3840
actgtcggta	tgaacgtcga	agagtctgcc	acacactccg	ggttcatcaa	cagtgccttc	3900
gcgtctctta	cttttgtaga	aggaaatgca	gcctctgagt	tttctccaag	aaatcattga	3960
tgaagggtg	aaaagatggg	tatcaccogg	agttcatgac	aagccctggc	tcagacacgt	4020
gagcaaggtc	tacagcccca	aagataggct	gccctgcaac	atgtatttat	aagataggag	4080
aaaaaaatgg	gtagttggag	ggttgatcaa	cttacttcoct	ctcaaacata	tatatctcat	4140
ctaagtgtgc	aggggaaaaac	tctgtagaac	tactgggata	cctgctcacc	cccaggagcc	4200
tcatgaataa	gtctctgctt	ctgccttgta	gccatgagca	ttactgcacc	tgataccctt	4260
gcagcttccct	aggaagagg	gaggaagtga	cttggccctt	gtctgggttaa	ggtaagagga	4320
gataaatccc	ttctcattga	ttagggtag	aggggtcatg	tgctctatca	ttggtagacc	4380
agttgggaca	tgggtttata	ccaaagtcac	cactctgagg	ttctgtgtac	caccaggctg	4440
aactcccata	tctacatgg	acataggaca	acaccaagca	gaaggaggtt	ttaggactaa	4500
actgaaggac	agagatgcgg	tttctaatac	actaggaggt	gccaggggcca	gcctctctaa	4560
ccactatagg	acactgtgga	gtctgggttac	aaagagagat	tactcaaggt	ccttagcact	4620
gattacagag	catatctcag	atgccttctg	ctgaccagat	gtatctttgc	ataatctgcc	4680
tatccagatt	cagaaaaattg	atgccacata	gccaaagtga	ctttcaggaa	cagacgattt	4740
aaaaacaggc	agagagatgt	gagagaaagg	agaaggagag	agagaaggga	gagggagaga	4800
agagagaggg	agacggagaa	ggaaagaggg	agaaggagaa	ggagagaagg	ggcatggaca	4860
gagggagggg	cagaaggaga	gaggagatag	agagggggat	aaggaagaag	ggagggaggg	4920
agagagagag	aaggctaagt	ctttccatac	ctgggtccca	atacctctta	taacccaaag	4980
acatggtttc	acatatcaca	atgcggttgg	gatatagata	actgtaaata	cttgtgaaaa	5040
taatggggct	gagatctggg	gttttcatga	tagtttcaaa	gtcacccgtac	tgactaaaaac	5100
cttccactgg	cccactctca	gcttctaat	ctgagggtat	caaatttccc	actaagtgtg	5160
tttagaaga	tctccacctt	tttgcccttg	tcttccagtg	ccccacctac	gttctgggtc	5220
cccacatctg	atgtcttctc	agtgattctg	gccctgacctg	ctccacagct	acaaacctct	5280
tctataaatg	agctctgtgc	tgagccatca	tcttgaatca	atccacctta	agcagatgtt	5340
ttgcttattt	ttctgtgtgc	catactacag	aggaaaggta	ggcatgtaga	agctgaagca	5400
tctcacctca	ttccaagcac	cctcagcttc	taaatgtgcc	cccttgtttc	cagaagtgca	5460
acctcaagca	tcttttattc	attcatctta	gagggccaca	tgtgctgtag	tgttataaga	5520
tgaattttaa	agcattaatt	attcctaaca	agccaattaa	acaagccaaa	aacatttcac	5580
agtcattccc	atggaacctc	tgaagcatct	tctgtctcta	accttgggtt	ttccagggtc	5640
gctctgggat	cacaggagct	gtcctgtcta	ccagccatat	aaaggcagac	ctatcagaat	5700
tacaccagac	ttctcaccat	agactataaa	agccagaata	tcttggacag	atgttatata	5760
gaaactaaga	gaacacaaat	gccagcccag	gctactatac	ccagcaaaaac	totcaattac	5820
catcgatgaa	gaaaccaaga	tattccatta	caagtccaaa	tttacacaat	atctttccat	5880
aaatccagcc	ctacaaagga	tagcagatgg	aaaactccaa	cacaggtagg	aaaactacac	5940
octagaagaa	gcactaaagt	aatcatcttt	caacacactc	aaaagaagat	aaaccacaaa	6000
acataatttc	acctctaaca	acaaaaataa	agtaggcaac	aatcactatt	ccttaatatc	6060
tcttttaaca	tcaatggact	caattctcca	ataaaaagac	atagactaac	agactgaata	6120
cataaacagg	acacagcatt	ttgctgcata	aagcaaacac	agcgttactt	ttttttttct	6180
aaatgacatt	ttttattaga	tattgtcttt	attgacattt	caaagtgtat	cccctttcct	6240
ggtttaccct	ctgaaatccc	ctatctcttc	cccctccccc	tgtcacccaa	tccaccctct	6300
cccacttcca	ggccctggca	atccctctata	tttgggcata	gagccctcac	aggaccaagg	6360
tactctcctt	gcattgatga	ccaactagtc	cattctctgc	tacaaatgca	gctagatcta	6420
tgagtcceac	catgttttct	tttggttggtg	gtttcatgcc	agggagctct	tggagtactg	6480
attggttcat	attgttggtc	tccctatggg	gttacaaaac	ccttcaactt	cttgggtcct	6540
ttctctggct	gctcatttgg	ggaccttggt	cgaagtccaa	tggatgactg	tgagcatcca	6600
cctctgtatt	tgccaggcac	tggcagagcc	tctcagaaga	cagctatata	aagatcctgg	6660
cagcaagctc	ttgttggtat	ccacaaaagt	gtctgggtgt	tgtctatggg	atggatcccc	6720
aaagggggcag	tctctggatg	gtcatttctt	cagctctctgt	tccacacttt	gtctctttaa	6780
ctccttccat	gactatttta	ttcttccctc	taagaaggac	cgaagtattc	atactttggt	6840
cttcttctct	gaaattcatg	tgttttgtga	attgtatctt	tgataattccg	aacttctggg	6900
ctaatatcca	cttatcagtg	agtgaatata	atgtgtgttc	ttatgtgatt	gagttacctc	6960
actcaggatg	atatctctca	gaaccatcca	tttgtctaag	aatttaaatga	attcattgtt	7020
tttaatatgct	gaggagtact	ccattgtgta	aatgtaccac	atcttctgta	cccattgttc	7080
tcttgagggg	catctgggtt	ctttaaagct	tctggacatt	aaatataagg	ctgctatgga	7140
aatagtggag	aatgtgtcct	tattacatgt	tggagcatct	tctgggtata	tgcccaggag	7200
tgctattgct	ggatcctctg	atagtactat	gtccaatttt	ctgaggaact	gccaaaactga	7260
tttacagagl	ggltgtacca	gcttgcaatt	ccaccagcaa	lggagaaatg	ttcccccttc	7320
tccacatcct	caccaacatc	tgctgtcacc	tcaatttggt	cttagtgatt	cagacagggtg	7380

ES 2 720 186 T3

tgagggtggaa	tatcagggtt	gtttggcatt	tccctgatga	ctagtgatat	tgaaaaaaat	7440
tttaagtgtt	tctcagccat	tcagtattct	tcagttgaga	attcactggt	tagctctgta	7500
ctcagggtttt	tttaataggg	ttatttgggt	ttctggagtc	taacgtcttg	aattctttct	7560
atataattgga	tatttagccct	ctgtcatatt	taggattggg	aaagatcttt	cccaatatgt	7620
tggtgcctt	tttgtgtcct	ttgccttaca	gaaccttttt	aattttatga	ggtcccattt	7680
gctaattctt	cattttacag	cacaagccat	tggtgttctg	ttcaaaaaatc	tttccccctg	7740
aacctatct	tcgaggatct	tccccacttt	ctcctctata	agtttcagt	tctctattat	7800
tgtgctgagg	ggtaccqaag	ttcctattcc	gaagttccta	ttctctagaa	agtataggaa	7860
cttccctagg	gtttaaaccc	gcggtggagc	tctgatgtgg	gaacgcttca	gtgttcagga	7920
accatatgat	ttatttaaaa	tatagaatca	aaagtaccaa	tttgcagttt	tgaaagattt	7980
attccagtg	aagcattagc	aatgcaccaa	catcaggtga	tttctgaatc	caacacgtct	8040
tatgtcctca	tgatattaaa	aaaaaaaaaa	ggccatccag	aactgtgaac	ttgagttcta	8100
ccttggtccc	tactgacatt	cagattttct	tttttgcatt	ctctttatct	tacaggagac	8160
aggaggggag	ggctaactca	ttttactttg	gctgtccct	tgctggctct	tgccagaac	8220
gtaaagtagc	ttgcaagtct	tcaaactctaa	aaatcttagt	aaactcctaca	cgagtggcaa	8280
tgccaaagag	cagtgcacaa	aagaggaagt	aaatacgacc	aaagagtatt	cttaaataca	8340
ccactggctc	ttgtttttgt	tttattgtgt	gcctttgaac	tgagggggac	ccactgtcta	8400
tgtctccact	tagtccctct	tctttgcact	ctggaggctt	ccaacaaaaa	tgacaatggc	8460
aattccgatg	attgtttacac	actcctctaa	aactgcattt	ttctgggggtg	cagtcataac	8520
ccaaatgaga	taaacttcca	ctgcaagctc	cttgatcaca	gaacttactt	ttggagcagg	8580
gggtaccatg	tctcaccatt	ccagcatctg	ttgtttctgt	cccacgatgt	tcataaagcc	8640
caaagcaggt	aaaccagag	ataatcgatt	gatggaatga	aacatgttct	tgcaaatatg	8700
gaagattggg	gacatttgga	cactgcaacc	ttccacacag	cttgtcctga	tcagcacaag	8760
cattgaatgt	gaggctttct	tctgtcttag	tacaatgccc	aaatcgaaac	cgttggttgt	8820
tgatgtcaca	gcacttaata	ttagcattct	tagcacttac	accaaagatt	tccatgcatt	8880
gtatgttgcg	atcagtgca	ttacctttat	agcagtaacc	atcttctgag	catggtgtcc	8940
catcttgca	ataagtgtca	tctgggcaaa	tgtatttagt	cccattacag	tactctggaa	9000
gatcacatat	gttctggata	ggtctgcaga	gtgtcccaga	aggactgtaa	gtgcaatttg	9060
cacagcataa	ttctttatca	caaatgctac	caggtgttaa	cctgcaatca	tttccacagc	9120
agggatctga	ataacatgcc	ttttgggagc	cacagtcaca	ctgtctcatcg	ttatctactt	9180
tgaagtttcc	acaaaactta	taagtcaatg	atgtattata	ataaacatga	cggctcataga	9240
aaagacatgg	catcagacca	ggagtattaa	gtatgttgct	tatctctgca	agggaacaat	9300
tgctgaaagc	atctgttaat	tgaggatgtc	tgaacataat	gcagggtgttc	cttctctggc	9360
agacacagta	cccccatca	tattttaagc	ctaaaactcct	tccaacacga	ttggttatta	9420
taggagataa	aaataaagga	tttcgatcat	atttaccat	acaaattagg	gctaagggaag	9480
aacatatact	cctctcagct	ggattaacct	ggttatcttg	tgcccatac	ttattaagta	9540
aaactctgc	atcaggctta	aatttattat	aaaagactga	cacatagtaa	tataagccg	9600
acctcctgg	aactgcaaac	tcaagtgcga	atggatcaga	attgggtgtac	acagtcatga	9660
gaaagacata	gtaccgcata	tgaagattgg	tcagataggt	gtccattaaa	ctaataactt	9720
gaaacaaata	cccaacagta	gatgaaagt	tgtaacctgc	agcagaatta	tatacagaat	9780
tggttgcttg	aaagtggcct	tttatagcag	ctggatgtgt	agcgtagtct	ttactagata	9840
ttctgggagc	tccatctgca	tattccaatc	tgaggagggg	agaacctgta	ttatggctcc	9900
agtgtctcca	tgcatctata	ggcctgtgt	catcagactc	agatactatc	tgagaaacaa	9960
ggtgttcaaa	gctctgtgaa	tcattgaggg	gtttgatttc	ataggtaagg	tcataaact	10020
tcatagcccc	tgacaggccc	ccataascaag	tatccacagt	gacctggat	tgtgggatcc	10080
cctccaggta	gccaatatag	taacaatcta	caggaaaaaa	ggggtaatcc	atctgtaagg	10140
ctccttggtc	atcttgagtt	gtcagcaaca	agtgtctggg	ccaaatgagt	gtctttctcc	10200
gcagggtggat	gatatgtctc	tgccccgaa	aatgcaagct	atatgagagc	agtctttgtg	10260
cttggaagtc	tttggtatgg	tagatctcct	tccgaggaat	aaccacctcc	gatgagatgt	10320
aacgccaagt	aggatggcct	tgagaacacc	agactggaac	caggaggagc	agccagagtg	10380
caaatagcaa	gaggaggacc	ctggggacca	cagggtcttc	cactagcctc	atgccccagg	10440
tcagagataa	catcctgggt	ggagctaaat	ccctctgctg	tggccactgc	ctggtctaga	10500
aaatactgac	agaggactaa	aaacctcctc	aggctcccaa	cctaagtggg	taccagaca	10560
actggagtta	ggtaacagtc	actgggtgtg	gcagggaattg	agtctgaatg	tgttagctga	10620
ggttgagggt	aaatattgtc	aaaagggatg	tctataaatg	tgccctggaca	agaaaagtca	10680
gaagcagcaa	ggagtgtctc	tgacaggctc	aatcctttct	tttctttttt	tgaagttcaa	10740
aatatcattt	ccacgtgaat	gtatttggtt	cccagtggtga	ctctgggtct	ctttctagga	10800
gtcaatatatt	ctttatatct	tggctcatgt	ttctcacagt	tgttctaatt	tcttggtttg	10860
ttttgtttgt	ttgtllgaac	gllagtagta	aatactgtct	atattagcct	tttagctata	10920
aatgattgtt	tttatttctt	ctaatacatat	tttgtttgag	ttttgggttaa	actattttaca	10980

```

aatgagtttt ttttttttcc ttttgggtgt tgctcgaaag tttggagctt tctgttaata 11040
ttgtgttggt attttttccaa tattattaga cctgagaatt ctatctgggt acctgtgaac 11100
tctagaattt ttaaaaaattc catctcttgg gaacattacc tctgaccccg tctgaggccg 11160
aagtggctgt cccctcccaa ccttttagtat ctttctttcc tgactattgg gatttcttca 11220
agcaatcagg ctgatgggtt ctcagcagtg agaccagtag actgccggt tgaacgtcga 11280
agagactgcc acacactcca gggtcatcaa cagtgccttc gcgtctctta cttttgtaga 11340
aggaaaagca gcctctgagt tatctccaag aaatcattaa tgaaagagtt aaaagatggg 11400
tatcaccggg agttcatgac aagccctggc tcagacacgt gagcaaggtc tacagcccca 11460
aagataggct gccctgcaac atgtatttat aagatagaag aaaaaaatgg gtggttgag 11520
ggttgatcaa cttacttcct ctcaaacata tatatctcat ctaagtgtgc aggggaaaac 11580
tctgtaggac tactgggatt gttattatca ttattattat tattattatt attattatta 11640
ttattattat tattaactta aggcatttta ttagatattt tcttcattta gttttcaaat 11700
gttatccccc gaacctccta tactctctcc ctgccctgct cccaaccca cccactccta 11760
catcctggcc ctggcattcc cctatactgt ggcagatgat cttcgtaaga ccaagagcct 11820
ttcctcccat tgatggccta ctaggctatc ctcttttaca tatgcaacta gagtcacagc 11880
tctggggagg tattgcttag ttcataattgt ttttccctcc atagggttgc agatcccttt 11940
agcctcttgg glactttctc tagctctctc allggggggc ctgtgttcca tccaatagat 12000
gactgtgagc atccacttct gtatttgcca ggtattggca tggatcttac tgcaccttct 12060
gaactctcta agcagctttc ctggtcacct ccaggagcct catgaataag tctctgcttc 12120
ccccttgtgg ctatgagcat tactgcacct gatacacctc gcagcttctc aggggaagagg 12180
gaggaagtgg cttggccctt gtctgggttaa ggtaagagga gataaatccc ttctcatgaa 12240
ttaggggtgag aagggtcatg tgctctatca ttggtgacca acttggggac atgggcttat 12300
acagtcatca ctctgaggct ctgtgtacca ccagactgaa ctcccatatc ctacatgcac 12360
ataggacaac accaagtaga aggaggtttt aggactaaac tgaaggacag agatgggggt 12420
tctaaacaac tagggagtgc cagggccagc ctctctaacc actataggac actatggagt 12480
ctgggttaca agagagatta ctcaaggctc ttagcactga ttacagagca tatctcagat 12540
gccttctgct gaccagatgt atctttgcat aatctgccta tccagattca gaaaattgat 12600
gccacatagc caagtggact ttcaggaaca gacgatttaa aaacaggcag agagatgtga 12660
gagaaaggag aaggagagag agaagggaga gggagagaag agagagggag acggagaagg 12720
aaagagggag aaggagaagg agagaagggg catggacaga gggagggaca gaaggagaga 12780
ggagatagag agggggataa ggaagaaagg agggagggag agagagagaa ggctaagtct 12840
ttccatacct ggggtccaat acctcttata acccaagcac atggtttcag atatcacaa 12900
gcggttgagg tatagataac tgtaaatact tgtgaaaata atggggctga gatctgggg 12960
tttcatgata gtttcaaagt cactgtactg actaaaacct tccactggcc catctccagc 13020
ttgttaatct gagggtatca aatttccac taagtgtgtt tagaaagatc tccacctttt 13080
tgccctagtc ttccagtgc ccacctacgt tctggtctcc cacatctgat gtcttctcag 13140
tgattctggc cctgctgct ccacagctac aaaccccttc ctataatgag ctctgtgctg 13200
agccatcatc ctgaatcaat ccaccttaag cagatgtttt gcttattttt cctgtgtcca 13260
tactacagag gaagggtagg catgtagaag ctgaggcatc tcactctact ctaagcacc 13320
tcagtctcta aatgtgccc tttgtttcca gcagttcagc ctcaagcatc ttttattcac 13380
tcgtcttaga gggacacatg tgctgtagtg ttataagatg aaatttaaag cattagttat 13440
tcccaacaag ccaattaaac aagccaaaaa cattcatcag tcattcccat ggaacctctg 13500
aagcatcttc ctgctctaac cttgagtttc ctagggtctg tgtgggatca caggagctgt 13560
cctgtttacc agcctatcct gtcccacggg attcagttat tagtgggtgc gagggggacc 13620
gcaaacctgg aagaaaatgg gattggaaga gaaaagagaa acgaagacca agtagatctt 13680
ttcctatcaa ggtcttcgtt tattaggctg aggtgcctgg tgtaaagcat gcatcgcg 13740
gaataggaag gggctcaggg ggaattttac aaagaacaaa gaagcgggca tctgctgaca 13800
tgagggccga agtcaggctc caggcagcgg gagctccacc gcggtggcgc catttcatta 13860
cctctttctc cgcacccgac atagataaag ctta 13894

```

<210> 4
 <211> 251
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

ES 2 720 186 T3

<400> 4

```
ccagcttcat tagtaatcgt tcatctgtgg taaaaaggca ggatttgaag cgatggaaga 60
tgaggatcag gggcggttga agacaaagtg ccacacagcg cagccttcgt ctagaccccc 120
gggctaacta taacggtcct aaggtagcga ggggatgaca gattctctgt tcagtgcact 180
cagggtctgc ctccacgaga atcaccatgc cctttctcaa gactgtgttc tgtgcagtg 240
cctgtcagtg g                                     251
```

5 <210> 5
<211> 245
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sintética

<400> 5

```
aggggtcgag ggggaatfff acaaagaaca aagaagcggg catctgctga catgagggcc 60
gaagtcaggc tccaggcagc gggagctcca ccgcggtggc gccatttcat tacctctttc 120
tccgcacccg acatagataa agcttatccc ccaccaagca aatcccccta cctggggccg 180
agcttcccgat atgtgggaaa atgaatccct gaggtcgatt gctgcatgca atgaaattca 240
actag                                     245
```

15
20 <210> 6
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

25 <400> 6
caggtagcgc tgcagcagtc a 21

30 <210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> sintética

<400> 7
ggagatggca caggtagtg a 21

40 <210> 8
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> sintética

<400> 8
tccaggactg gtgaagc 17

50 <210> 9
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>

	<223> sintética	
	<400> 9	
5	tagtcccagt gatgagaaag agat	24
	<210> 10	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 10	
15	gagaacacag aagtggatga gatc	24
	<210> 11	
	<211> 17	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
25	<400> 11	
	tgagtccagt ccaggga	17
	<210> 12	
	<211> 28	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> sintética	
	<400> 12	
	aaaaattgag tgtgaatgga taagagtg	28
	<210> 13	
40	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> sintética	
	<400> 13	
	aaccctggtc agaaactgcc a	21
50	<210> 14	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 14	
	agagaaacag tggatacgt	19
60	<210> 15	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> sintética

 <400> 15
 5 aactacgcac agaagttcca gg 22

 <210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética

 <400> 16
 15 gctcgtggat ttgtccgc 18

 <210> 17
 <211> 16
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética
 25
 <400> 17
 cagagtcacg attacc 16

 <210> 18
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética
 35
 <400> 18
 tgagcagcac cctcacgtt 19

 <210> 19
 <211> 23
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética
 45
 <400> 19
 gtggcctcac aggtatagct gtt 23
 50
 <210> 20
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> sintética

 <400> 20
 60 accaaggacg agtatgaa 18

 <210> 21
 <211> 33
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 5
 <400> 21
 gctagtagtg gggcctacag gcctttgat atc 33
 <210> 22
 10 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> sintética
 <400> 22
 gcaaaagccc aggggagtg gagctactac acctatgctt ttgatatc 48
 20 <210> 23
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> sintética
 <400> 23
 gcgagagagg gtatagtggg aactactgag gactttgatt ac 42
 30 <210> 24
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> sintética
 <400> 24
 40 gcgagagggg cagtgggagc cctcttgac tac 33
 <210> 25
 <211> 36
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 50 <400> 25
 gcgaaacctg gtgggagcta ctctggttc gacccc 36
 <210> 26
 <211> 45
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 60 <400> 26
 gcgagaggag gagggataaa ctggaactcg aatgctttg atatc 45

5 <210> 27
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 10 <400> 27
 gcgagaggat ataactggaa ctacttgac tac 33
 <210> 28
 <211> 39
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 20 <400> 28
 gcgaaagagt ataactggaa ccactgtac ttgactac 39
 <210> 29
 <211> 33
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 30 <400> 29
 gcgagagaga taactggaac ccccttgac tac 33
 <210> 30
 <211> 39
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> sintética
 <400> 30
 gcgaggggat ataactggaa ctttcttt ttgactac 39
 <210> 31
 <211> 36
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> sintética
 <400> 31
 gcgagagga actggaactc tctggcctt gactac 36
 55 <210> 32
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> sintética
 <400> 32

gcgaaaaggg ctactatggt tcggggagct ctgactac 39

5 <210> 33
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sintética

15 <400> 33
gcgagagata ttactatggt tcggggaggt attataacga aggtctacgg tatggacgtc 6C

20 <210> 34
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> sintética

30 <400> 34
gcgagagagt atagcagctt tgactac 27

35 <210> 35
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> sintética

45 <400> 35
gcgagagaga gtatagcagc tcgttgtagc tac 33

50 <210> 36
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> sintética

60 <400> 36
gcaagagagg ataggagctc gccctcggg tactttgact ac 42

65 <210> 37
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

70 <220>
<223> sintética

75 <400> 37
gcgagagatc ttggggaagg ctac 24

80 <210> 38
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

85 <220>
<223> sintética

<400> 38
 accacccata actggggagg gtttgactac 30

 5 <210> 39
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> sintética

 <400> 39
 gcgagagata ggggaccg 18

 15 <210> 40
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> sintética

 <400> 40
 caacagagtt atagtacccc tccggagacg 30
 25
 <210> 41
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> sintética

 <400> 41
 caacagctta atagttaccc tcggacg 27
 35
 <210> 42
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> sintética

 45 <400> 42
 caacagctta atagttacca ttcact 26

 <210> 43
 <211> 27
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética
 55
 <400> 43
 caacatttta atagttaccc gctcact 27

 <210> 44
 <211> 27
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>

	<223> sintética	
	<400> 44	
5	cagcagtata ataactggcc tctcact	27
	<210> 45	
	<211> 27	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 45	
15	ctacagcata atagttaccc gtggacg	27
	<210> 46	
	<211> 27	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
25	<400> 46	
	ctacagcata atagttaccc tcggacg	27
	<210> 47	
	<211> 27	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
35	<400> 47	
	cagcagtatg gtagctcacc tcggacg	27
	<210> 48	
40	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> sintética	
	<400> 48	
	atgcaaggta cacactggcc gtggacg	27
50	<210> 49	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 49	
60	atgcaagggt cacactggcc gtacact	27
	<210> 50	
	<211> 27	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
5	<400> 50	
	atgcaaggta cacactggcc gctcact	27
10	<210> 51	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 51	
	caacagtatg ataattctccc tcccact	27
20	<210> 52	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 52	
	caacagtatg ataattctccc attcact	27
30	<210> 53	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 53	
40	caacagtatg ataattctccc cgtcact	27
	<210> 54	
	<211> 27	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
50	<400> 54	
	caacagtatg ataattctccc gatcacc	27
	<210> 55	
	<211> 24	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
60	<400> 55	
	caacggattt acaatgccga cacc	24
	<210> 56	

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

5

<220>
 <223> sintética

<400> 56
 caacagagtt acagtacccc catgtacact 30

10

<210> 57
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> sintética

<400> 57
 caacagagtt acagtacccc tctcact 27

20

<210> 58
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> sintética

<400> 58
 caacagagtt acagtactcc tcccact 27

30

<210> 59
 <211> 219
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> sintética

40

<400> 59
 acttttcagaa tgttcttgaa cagtctctga gaaacacgga agacggccgc ataacttcgt 60
 atagtataca ttatacgaag ttattctaga cccccgggct cgataactat aacggtccta 120
 aggtagcgac tcgagataac ttogtataat gtatgctata cgaagttatc catggtaagc 180
 ttacgtggca tacagtgtca gattttctgt ttatcaagc 219

45

<210> 60
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> sintética

<400> 60
 agctgaatgg aaacaaggca a 21

55

<210> 61
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> sintética

5 <400> 61
 ggagacaatg cccagtgga 19

10 <210> 62
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> sintética

<400> 62
 tcccataggg ctaggatttc c 21

20 <210> 63
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintética

<400> 63
 tcccctcaca ctgttcccc 19

30 <210> 64
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> sintética

<400> 64
 ggtggagagg ctattcggc 19

40 <210> 65
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintética

50 <400> 65
 gaacacggcg gcatcag 17

55 <210> 66
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

60 <400> 66
 tcaaccttcc ccagcctgtc t 21

<210> 67
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 5
 <400> 67
 cccagagag agaaaacaga tttt 24
 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> sintética
 15
 <400> 68
 ccctggtgaa gcatgtttgc 20
 <210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> sintética
 25
 <400> 69
 tgtggcctgt ctgccttacg 20
 <210> 70
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> sintética
 35
 <400> 70
 cacacctaga ccccggaagt c 21
 <210> 71
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> sintética
 45
 <400> 71
 tcgcttgcc agttgattct c 21
 <210> 72
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> sintética
 55
 <400> 72
 tgcggccgat ctagcc 17
 <210> 73

<211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> sintética
 <400> 73
 ttgaccgatt ccttgagg 18
 10 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> sintética
 <400> 74
 20 gcaaacaaaa accactggcc 20
 <210> 75
 <211> 19
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 30 <400> 75
 ggccacattc catgggttc 19
 <210> 76
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 40 <400> 76
 ccatgactgg gcctctgtac ac 22
 <210> 77
 45 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> sintética
 <400> 77
 caagtcaggg tgctaatgct gtatc 25
 55 <210> 78
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> sintética
 <400> 78
 65 cacagcttgt gcagcctcc 19

5 <210> 79
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 10 <400> 79
 gggcactgga tacgatgtat gg 22
 <210> 80
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 20 <400> 80
 tcataggttag gtctcagttt g 21
 <210> 81
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 30 <400> 81
 tgatctgcgc tgttcatcc t 21
 <210> 82
 <211> 31
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 40 <400> 82
 tgacatgaac catctgttc tctctgaca a 31
 <210> 83
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> sintética
 <400> 83
 agagacgctc cgaggtaag gtgctctag 29
 55 <210> 84
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> sintética
 <400> 84

	tgggcacaac agacaatcgg ctg	23
5	<210> 85 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> sintética	
	<400> 85 accctctgct gtcct	16
15	<210> 86 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> sintética	
	<400> 86 ccaagcagga ggtgctcagt tccaa	26
25	<210> 87 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> sintética	
35	<400> 87 tccacactgt cggctgggag ctca	24
40	<210> 88 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
45	<400> 88 acgagcgggt tcggccatt c	21
50	<210> 89 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
55	<400> 89 ctgttcctct aaaactggac tccacagtaa atggaaa	37
60	<210> 90 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	

<400> 90
 tgccgcttat acaacactgc catctgc 27

 5 <210> 91
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> sintética

 <400> 91
 agaagaagcc tgtactacag catccgttt acagtca 37

 15 <210> 92
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> sintética

 <400> 92
 gggctacttg aggacctgc t 21
 25
 <210> 93
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> sintética

 <400> 93
 gacagccctt acagagtttg gaa 23
 35
 <210> 94
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> sintética

 <400> 94
 aagaccagga gctctgccta agt 23
 45
 <210> 95
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> sintética
 55
 <400> 95
 cccatcacga actgaagtg ag 22

 60 <210> 96
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>

<223> sintética
 <400> 96
 cagggcctcc atcccaggca 20
 5
 <210> 97
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> sintética
 <400> 97
 ccccagtggtg tgaatcactc taccctcc 28
 15
 <210> 98
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> sintética
 <400> 98
 cctctcctcc tcaccctcct 20
 25
 <210> 99
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> variación
 <222> (4)...(4)
 <223> r=a o g
 35
 <220>
 <221> variación
 <222> (9)...(9)
 <223> s=c o g
 40
 <220>
 <221> variación
 <222> 11, 12, 13
 <223> y=c o t
 45
 <400> 99
 atgrccdgst yyctctcct 20
 50
 <210> 100
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> sintética
 <400> 100
 ctctcactc agggcaca 18
 60

5	<210> 101 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
10	<220> <221> variación <222> (18)...(18) <223> s=c o g	
15	<400> 101 atggcctggg ctctgctct	20
20	<210> 102 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
25	<220> <221> variación <222> (11)...(11) <223> y=c o t	
30	<220> <221> variación <222> (13)...(13) <223> s=c o g	
35	<400> 102 atggcctgga ycsctctcc	19
40	<210> 103 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> sintética	
50	<220> <221> variación <222> 11, 16, 18, 21 <223> y=c o t	
55	<220> <221> variación <222> (15)...(15) <223> r=a o g	
60	<220> <221> variación <222> (20)...(20) <223> m=a o c	
	<400> 103 tcacccatggc ytggrycycm ytc	23
65	<210> 104 <211> 22 <212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
5	<400> 104 tcaccatggc ctgggtctcc tt	22
10	<210> 105 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> sintética	
20	<220> <221> variación <222> (16)...(16) <223> m=a o c	
25	<220> <221> variación <222> (19)...(19) <223> y=c o t	
	<400> 105 tcaccatggc ctggamtcyt ct	22
30	<210> 106 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> sintética	
40	<400> 106 tcaccatggc ctgggtcca ctactt	26
45	<210> 107 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
50	<400> 107 tcaccatggc ctggactcct	20
55	<210> 108 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
60	<400> 108 tcaccatggc ctggatgatg ctt	23
	<210> 109 <211> 22	

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 5
 <400> 109
 taaatatggc ctgggctcct ct 22
 10
 <210> 110
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> sintética
 <400> 110
 tcaccatgcc ctgggctctg ct 22
 20
 <210> 111
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> sintética
 <400> 111
 tcaccatggc cctgactcct ct 22
 30
 <210> 112
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> sintética
 <400> 112
 cccaagcfta ctggatggtg ggaagatgga 30
 40
 <210> 113
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> sintética
 <400> 113
 gtaaaacgac ggccag 16
 50
 <210> 114
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> sintética
 <400> 114
 caggaaacag ctatgac 17
 60

<210> 115
 <211> 440
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintética

10

<400> 115

```

gggcctgggc tctgctgctc ctcaccctcc tcactcaggg cacaggggcc tgggcccagt 60
ctgccctgac tcagcctccc tccgcgtccg ggtctcctgg acagtcagtc accatctcct 120
gcactggaac cagcagtgac gttgggtggt ataactatgt ctcttggtac caacagcacc 180
caggcaaagc ccccaaactc atgatttatg aggtcagtaa gcggccctca ggggtccctg 240
atcgcttctc tggctccaag tctggcaaca cggcctccct gaccgtctct gggctccagg 300
ctgaggatga ggctgattat tactgcagct catatgcagg cagcaacaat ttcgtcttcg 360
gaactgggac caaggtcacc gtccctagggg ctgatgctgc accaactgta tccatcttcc 420
caccatccag taagcttggg                                     440
  
```

<210> 116
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> sintética

20

<400> 116

```

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacaggggc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctcgcgtccg ggtctccttg gacagtcagt caccatctcc 120
tgactggaac ccagcagtgga cgttgggtgg tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaag ccccaaactc catgatttat gaggtcacta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggtctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtccctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtaagcttgg g                                     441
  
```

25

<210> 117
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> sintética

<400> 117

```

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacaggggc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctcgcgtccg ggtctccttg gacagtcagt caccatctcc 120
tgactggaac ccagcagtgga cgttgggtgg tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaag ccccaaactc catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggtctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtccctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtaagcttgg g                                     441
  
```

35

<210> 118
 <211> 438
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> sintética

<400> 118

5

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

<210> 119
<211> 438
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> sintética

15

<400> 119

```
atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc gggctctctg gacagtcagt caccatctcc 120
tgacttgga ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaag cccccaact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggtgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa tgtcttcgga 360
actgggacca aggtcacctg cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420
ccatccagta agcttggtg 438
```

20

<210> 120
<211> 441
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> sintética

<400> 120

```
atggcctggg ctctgctcct cctcaccctc ctactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
```

```
tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc gggctctctg gacagtcagt caccatctcc 120
tgacttgga ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaag cccccaact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggtgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtaagcttgg g 441
```

30

<210> 121
<211> 442
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> sintética

ES 2 720 186 T3

<400> 121

```
atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacaggggc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc ggggtctcctg gacagtcagt caccatctcc 120
tgcactggaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaag cccccaaact catgatttat gaggtcagta agcggcctcc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtctt 360
cggaactggg accaagggtc cgtcctagg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt 420
cccaccatcc agtaagcttg gg 442
```

5 <210> 122
<211> 428
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sintética

<400> 122

```
ccttcatttt ctccacaggt ctctgtgctc tgcctgtgct gactcagccc ccgtctgcat 60
ctgccttgct gggagcctcg atcaagctca cctgcaccct aagcagtgag cacagcacct 120
acaccatcga atggtatcaa cagagaccag ggaggtcccc ccagtatata atgaaggtta 180
agagtgatgg cagccacagc aagggggacg ggatccccga tcgcttcatt ggctccagtt 240
ctggggctga ccgctaacct accttctcca acctccagtc tgacgatgag gctgagtatc 300
actgtggaga gagccacacg attgatggcc aagtcggttg tgtcttcgga actgggacca 360
aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca ccatccagta 420
agcttggg 428
```

15 <210> 123
<211> 441
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

25 <400> 123

```
atgacctgct cccctctcct cctcaccctt ctcattcact gcacaggggc ctgggcccag 60
tctgtgttga cgcagccgcc ctcagtgtct gcggccccag gacagaaggt caccatctcc 120
tgctctggaa gcagctccaa cattgggaat aattatgtat cctggtacca gcagctccca 180
ggaacagccc ccaaactcct catttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240
cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcaccgg actccagact 300
ggggacgagg ccgattatta ctgcggaaca tgggatagca gcctgagtgc ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaagggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
```

```
ccaccatcca gtgagcagtt a 441
```

30 <210> 124
<211> 441
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> sintética

<400> 124

ES 2 720 186 T3

```

atgacctgct cccctctcct cctcaccctt ctcatctact gcacagggtc ctggggcccag 60
tctgtgttga cgcagcgcgc ctcagtgtct gcggccccag gacagaaggt caccatctcc 120
tgctctggaa gcagctccaa cattgggaat aattatgtat cctggtacca gcagctccca 180
ggaacagccc ccaaactcct cattttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240
cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcacagg actccagact 300
ggggacgagg ccgattatta ctgcggaaca tgggatagca gcctgagtgc ggcttttttt 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtgagcagtt a 441

```

<210> 125
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 125

```

cccgggcaga gggtcacat ctcttggtct ggaagcagct ccaacatcgg aagtaatact 60
gtaaaactgg accagcagct cccaggaacg gccccaaaac tctcatctta tagtaataat 120
cagcgccct caggggtccc tgaccgattc tctggctcca agtctggcac ctcagcctcc 180
ctggccatca gtgggtctca gtctgaggat gaggctgatt attactgtgc agcatgggat 240
gacagcctga atggttatgt ctccggaact gggaccaagg tcaccgtcct aggggctgat 300
gctgcaccaa ctgtatccat ctcccccacca tccagtgage agtta 345

```

<210> 126
 <211> 432
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 126

```

atggcctgga cccctctcct gctccccctc ctcaatttct gcacagtctc tgaggcctcc 60
tatgagctga cacagccacc ctcggtgtca gtgtccccag gacaaacggc caggatcacc 120
tgctctggag atgcattgcc aaaaaaatat gcttattggg accagcagaa gtcaggccag 180
gcccctgtgc tggtcattca tgaggacagc aaacgacct ccgggatccc tgagagattc 240
tctggctcca gtcagggac aatggccacc ttgactatca gtggggccca ggtggaggat 300
gaagctgact actactgtta ctcaacagac tacagtggta atcatgtctt cggaactggg 360
accaaggtca ccgtcctagg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt cccaccatcc 420
agtgagcagt ta 432

```

<210> 127
 <211> 426
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 127

ES 2 720 186 T3

```

atggcctgga ctctctcttt tctgttcttc ctcaattgct gccaggggc caattcccag 60
gctgtggtga ctccaggagcc ctcaactgact gtgtccccag gagggacagt cactctcacc 120
tgtggctcca gcactggagc tgtcaccagt ggtcattatc cctactgggt ccagcagaag 180
cctggccaag cccccaggac actgatttat gatataagca acaaacactc ctggacacct 240
gcccggttct caggctccct ccttgggggc aaagctgcc tgaccctttc gggtgccag 300
cctgaggatg aggctgagta ttactgcttg ctctcctata gtgggtgctta tgtcttcgga 360
actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420
ccatcc 426

```

<210> 128
 <211> 331
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 128

```

agtggctctg ggacagacgg ccaggattac ctgtggggga aacaacattg gaagtaaaaa 60
tgtgcaactg taccagcaga agccaggcca ggcccctgtg ctgggtcatct atagggataa 120
caaccggccc tctgggatcc ctgagcgatt ctctggctcc aactcgggga acacggccac 180
cctgaccatc agcagagccc aagccgggga tgaggctgac tattactgtc aggtgtggga 240
cagcagcact tatgtcttcg gaactgggac caaggtcacc gtcttagggg ctgatgctgc 300
accaactgta tccatcttcc caccatccag t 331

```

<210> 129
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 129

```

actcctctcc tctcctgttt cctctctcac tgcacagggt cctctctgca ggctgtgctg 60
actcagccgt ctccctcttc tgcattctct ggagcatcag ccagtctcac ctgcaccttg 120
cgcagtggca tcaatgttgg tacctacagg atatactgg accagcagaa gccagggagt 180
cctccccagt atctcctgag gtacaaatca gactcagata agcagcaggg ctctggagtc 240
cccagccgct tctctggatc caaagatgct tcggccaatg cagggatttt actcatctct 300
gggctccagt ctgaggatga ggctgactat tactgtatga tttggcacag cagcgcttat 360
gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc ctaggggctg atgctgcacc aactgta 417

```

<210> 130
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 130

ES 2 720 186 T3

```

tttctgttcc tctcacttg ctgcccaggg tccaattctc agactgtggt gactcaggag 60
ccctcactga ctgtgtcccc aggagggaca gtcactctca cctgtgcttc cagcactgga 120
gcagtcacca gtggttacta tccaaactgg ttccagcaga aacctggaca agcaccagg 180
gcactgattt atagtacaag caacaaacgc tcttgaccc ctgcccgggt ctcaggctcc 240
ctccttgggg gcaaagctgc cctgacactg tcagggtgtgc agcctgagga cgaggctgag 300
tattactgcc tgctctacta tgggtggtgt tatgtcttcg gaactgggac caaggtcacc 360

```

```

gtcctagggg ctgatgctgc accaactgta tcc 393

```

5
 <210> 131
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> sintética
 <400> 131

```

atggcctggg ctctgctgct cctcactctc ctcaactcagg acacaggggc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctgc ctccgtgtct gggctctctg gacagtgcag caccatctcc 120
tgactggaa ccagcagtga tgttgggagt tataaccttg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaag cccccaact catgatttat gagggcagta agcggccctc aggggtttct 240
aatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgacaatctc tgggctccag 300
gctgaggacg aggctgatta ttactgctgc tcatatgcag gtagtagcac ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatc 417

```

15
 <210> 132
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> sintética
 <400> 132

```

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
tcttgcaactg gaaccagcag tgacgttggt gggtataact atgtctcctg gtaccaacag 120
caccagggca aagcccccaa actcatgatt tatgaggtea gtaatcggcc ctcaggggtt 180
tctaactcgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct cctgaccat ctctgggctc 240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcag cacttatgtc 300
ttcggaaactg ggaccaaggt caccggcctg ggggctgatg ctgcacca 348

```

25
 <210> 133
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> sintética
 <400> 133

```

aacaaccgag ctccagggt 20

```

35
 <210> 134
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

	<220>		
	<223> sintética		
5	<400> 134		
	agggcagcct tgttccaa	19	
10	<210> 135		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 135		
	cctgccagat tctcaggctc	20	
20	<210> 136		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 136		
	catcacaggg gcacagactg	20	
30	<210> 137		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 137		
	gatttgctga gggcagggt	19	
40	<210> 138		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 138		
50	ccccaagtct gatccttct t	21	
55	<210> 139		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 139		
	gctgaccaac gatcgctaa	20	
	<210> 140		
	<211> 19		
	<212> ADN		

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 5
 <400> 140
 taagcgccac actgcacct 19
 <210> 141
 10 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> sintética
 <400> 141
 cctgccagat tctcaggctc cctg 24
 20 <210> 142
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> sintética
 <400> 142
 30 ctgattggag acaaggctgc cct 23
 <210> 143
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> sintética
 <400> 143
 40 ccttcatact ctgcatcct cccttctcca 30
 <210> 144
 <211> 35
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 50 <400> 144
 ttcttctct tctgtgactc aattatttgt ggaca 35
 <210> 145
 <211> 159
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 60 <400> 145

ES 2 720 186 T3

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

<210> 146
<211> 159
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 146

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

<210> 147
<211> 159
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 147

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

<210> 148
<211> 159
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 148

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

<210> 149
<211> 153
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 149

tcggggaaca cggccaccct gaccatcagc agagcccaag ccgggggatga ggctgactat 60
tactgtcagg tgtgggacag cagcactgct gtgttcggag gaggcacca gctgaccgcc 120
ctcggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153

<210> 150
<211> 156
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> sintética

10

ttaataaaag	tatgtcattt	catcaattca	ataagttata	atagcaaaaa	accataataa	960
attatcacct	aaatgtcaat	acatttataa	actatggtac	ataaatagga	tattgaaatg	1020
ccattgatgc	tcctgatgaa	aattagcagg	cagtataaaa	tgataaatat	gaagcacatg	1080
tcaataaata	aaataagttt	tatgtaattt	aggagaaaa	ggtgataatg	acacaaaaatg	1140
tgaattatgg	atgcatctat	aaaattcttt	gtacatttgt	gaattgtaaa	tatttatctt	1200
agagacatta	ttactttgta	tatgttccat	ttgtctacct	atatgtccca	gtctccttac	1260
aaatgctatg	gccaaagaaa	taggcataca	tacatccttt	gcaggctgag	gcaggaaaaa	1320
gatcttacgg	aattttccag	tctatccttt	atctgtataa	gcaacttaag	aggccatgtg	1380
ctccaaatgg	tgcaaataca	agatggtaga	gcctctgtct	gcctggatcc	ttgagtggct	1440
gcatggagca	gagcaccttt	ctggccctgg	tgaagattgt	agcatgagca	agatataagc	1500
atttgttggg	gctaggccat	gagatttggg	gcagtgggat	aacctaccct	attatggaaa	1560
alataaalac	acaaaacaga	aaagagagag	agaagtgaga	gaagactgtg	agagaaglgc	1620
atgagagaag	actgtgtttt	gttcatttcc	tataattcta	tatcaccatg	ggatcctgtg	1680
ccttctgggtg	atcaaaactaa	tgttctacag	ctccaaagaa	gaatgctcgc	ctaactgtct	1740
cattccaatg	acctagagac	taaaagccaa	aaagaacctt	agaaattatc	tattgcattc	1800
tttgatgtaa	ggaaatatct	tagagggcac	agatagaaat	atcttaacct	aggtaactta	1860
gttcgtggca	gagctgaggc	taaaaccagg	ccttttgact	cctaattttg	tgctctttac	1920
accttctcac	atcacttctc	caacccaaag	tctagcagaa	aaggctaaaa	taagatatat	1980
gcatagattt	gctattataa	gtccatgtac	ttcctcagac	gctttaagat	ggggcttctc	2040
atggttcaca	ataagcagca	gaggggaagt	aataactatc	ttcgtctccc	ctactgctat	2100
ttgtgcagtt	tgaagcttat	ctcttaaatc	atgttttctt	ctcgtagtaa	atactacaac	2160
ttgtgccttt	tatgtgtgta	taaattttta	tataattttt	ttccatgaac	cattcaagta	2220
aaatggacac	tccaaaaaga	tgttcaataa	ggttacatgg	cttcacattg	ccccctctac	2280
accatcttgt	ggagctacac	attcacctca	cccaaatttg	agaaaaataa	tcaagaaaaa	2340
gactctcact	agcagtgaga	ccaagtcctt	aagcactaat	gtcatcagtg	cacatgcag	2400
cctcatgctg	ccaagcatgt	tttgggcgta	tccctggact	ggtttggtga	catgatcaaa	2460
ggtacatttt	ccacctgcat	agccccatcc	tggatctata	gccttccttg	tgtctttgtg	2520
aacaacctag	tgtgaactca	aagtatgaga	cagatctcaa	ttaattttaga	aagtattttt	2580
tccaagattt	aaggacaagc	ccatgataaa	gcctccagag	gtcctgatat	atgtgcccaa	2640
gggggtcggg	gcacagcttg	gtgttataca	ttttaggagg	acaagaaaca	tcaatcgata	2700
tgtagaagat	gtgcatcgct	ttgggtctgga	aagggtgtgac	aactcaaggc	aggggaagggg	2760
gcttctgctg	ggggttgcat	tgttttgagt	ctctgatcag	cctttcacat	gtgaaaggca	2820
ggtagagaaa	tagtcattta	tgccttagtc	tggcttattg	aaacagtagg	gcagaagaag	2880
cattgcataa	gcatttgtct	gaagtgaaca	gagggatgac	tttgagctct	gtcctttctt	2940
tgtccacaag	gaattacctt	gtgggcaaat	tgtgagggag	gtatgtagct	ttttttctt	3000
tgtagctatc	ttatttagga	ataaaatggg	aggcagggtt	gcctgatgca	attcccagct	3060
tgaatttccc	ttttggctta	gtgatttttg	gggtcctgag	gtttattttt	tctttcacat	3120
tagataaact	acttttcttt	ttctaattcc	ttttctactt	gtatgtgtta	cagctgactt	3180
atgttacttg	caaaaagaat	tctgactaat	gcaccatctg	actagaaggc	agggttcttc	3240
gatgataacg	aatctccag	aatctagtaa	acagaattgc	ctgaaaaaga	ggtgggtgtc	3300
ttcttgggga	atttctcatg	gcaatgaatg	gcaactggcc	aaaggattta	tgaccagact	3360
gagctctctt	ttatctattc	tgttactcac	caagacctat	tagggtttgt	gtccacagag	3420
gacactgggt	tctaagttct	agggttaaac	agtcactccc	caggcccacc	acaccatacc	3480
ctcctgacat	ctggtgaaca	gcaataaaa	tgtttcttat	tctgaaaatc	ctccaatact	3540
tccaccatcc	ccaaaaatgc	agtggaggag	gagagaaaa	gaattgttcc	attagagaac	3600
acaatatcca	ttatattatt	cttggccttt	gagatacctt	acaaaaacaa	tacaaaaaaa	3660
gtcccaattt	aacatctttt	aataatcttt	acaaaacaga	acacatctcc	tttcttgata	3720
atagtcaaga	ggctcagtg	caactgtggt	gaaaagtgtc	agattctggt	catgtttcaa	3780
aggtagaaaa	aatagaattt	gttaacatat	tggatgtgag	gcgtgggaga	aacgtgaaat	3840
caagggtggt	gcaagtgttt	aacctgagca	actagagaat	ttggaaggac	attttctgag	3900
atgggggaagg	caggcgggaa	tcagggatta	gagttgaaca	tattagacat	ttgagatgcc	3960
tgctagacct	ctaattggca	atatcccttg	gacagggtga	tgaatatgcg	tgattctgga	4020
gttcgggaaa	tagtccgggt	ggagatgcaa	atttgggaaa	cagggcgagg	ttactagcaa	4080
tgagttaaat	caatgaaggc	aggctgggac	ctggcaggta	acccaacaag	tagaggctga	4140
agagatgaga	agaaaacagc	acaggagact	tagaagcagt	cgctcaggag	aaggagtga	4200
accaagaaag	tgatgtccca	gagccaacaa	aataaggatt	tcttttctgt	ttacaaatgt	4260
aaaattaaaa	ggtttaataa	aaagaaaatt	tactttttatg	gttggtttgt	attaagtgtt	4320
ccaaacactg	tctcctattt	gtagaatcag	aactctctca	tggcagtaga	aaatttggaa	4380
agttactttt	taaaagggtg	gtgcactgct	gccctttgtc	ggtcaagttt	atgcactgca	4440
aattccaagg	acgattgctc	gtcagctttt	ctccttttaa	atagctcagg	ctgtacaagc	4500

tagaaagaac	ctcgcaagat	attccttcca	acattttgc	ttgacttatg	ggaagtgcag	4560
gttcagccag	aaaagttgtg	tgcaaggccg	tttatgtaag	tttatcagac	ctgattctta	4620
cggctcttcc	cattgtttcg	agcctccctt	ccattcactt	cccgtcata	cgcgaccaag	4680
tataggacag	gagtagttat	tctgcacttt	atagcagctc	cactgtctgg	cactctgatg	4740
ttcttttaatt	acaagcttta	tgacagtgat	tcaccaacctg	ctccacagcc	tccacctagt	4800
ggcagaaaga	agaaaatgtg	tgtaactcgg	gagtctctgg	tctgaaagct	ccggggatc	4860
atctcttcaa	agtcttgagc	ttgtttttgt	ttgtatttat	ttattttatt	gttttagaga	4920
caaggtctcg	cactgcactc	cagcctggga	gacagagcga	gacaattcag	gatctatcta	4980
gtgaataaag	agatatacgt	aatgactgtt	ttatatgttg	gctgtagcgc	attcgaggga	5040
taattcgatt	ctgttctgct	ttcgaatgca	tggtctactg	taacctccaa	ctccgggct	5100
caagcgatcc	tcctacctca	gcttctccag	tagttgagct	tgattttatt	taaagtttca	5160
taaaattttg	gcattttctt	ccacaatatg	gccatgtgtg	ctttactata	aaatattttc	5220
atcacaaaat	ttacatcgct	ggaaatcccc	ataagccagt	ttgagaaaca	caacccaaga	5280
aagcagaaca	gactcaaatt	atcccttaaa	tcccccttaa	ccacaaatat	aaaacagtcc	5340
gtgactgggc	gtgttggtt	acacctgtaa	tcccagcact	ttggggaggc	aaggcggtg	5400
gattacttga	ctcaggaggt	tcaagaccag	cctggccaac	atggtgaaac	cccgtcccta	5460
ttaaaaatca	aaaattattc	aggagtgttg	gcaggcagtt	gtaatcccag	ctacttgagg	5520
ggctgaggca	ggagaatcac	ttgaacccag	gaggtggagg	ttgtagttag	ccaagattgt	5580
gccagtgcac	tccagcctgg	gcaacagagc	gagacttcca	tcttaaaaaa	aaaaaatcaa	5640
gtaataaaaa	tataaaaaaa	taaagcagtc	cctattgata	tctctttatt	cactaaatca	5700
acctggaatt	gacctgaatt	ctgatttttt	tttcatcatg	gattttttgc	attaattttg	5760
attgttttaa	tattgcatta	aaatattatt	tatcttgact	actgagtttg	cgggacctcc	5820
ttaaaattta	tgaccaaggc	aatgcctcac	tcactgcctt	taccataatc	tgggccacat	5880
atcaggggct	ccaatagcaa	gcaacatgac	ttttgaacag	ctaagacttc	tctcttcaat	5940
gtgaagacca	gatgggccct	gcaaacagtg	taacctctac	atgaaaatgc	acgagattcc	6000
aactacaacc	aggcacaaaa	gactctgatg	gtgaagtccc	agccctccaa	gtcccaactt	6060
cctgaaggga	aagagcaccc	caagttctga	ccagaggcca	gagtcataac	gaagatggaa	6120
tgtgagcttg	acatagaagg	ggtggttagc	cctggctcag	taatgaagag	gctttcggtc	6180
ctgaagggaag	agctcagcac	attcaaaagat	tagaagggaag	gtcccagtc	taggagcagg	6240
gaaggagaga	aggccaata	agaaacacag	acaggaggga	ggggtcaggg	caagatcata	6300
ctggaacaaa	ctagagagct	aataaaaagtc	acagtgcaca	gtcccccacat	ggaccagact	6360
cttcggaatc	tctaggcatc	aatttgggca	ccagtagttt	tcaaagtctc	ccagaagatt	6420
ctatgcacac	cagccaaggg	tgggaaccac	aggtgttggc	ctagggatca	tgacaatgag	6480
tttctaagtg	caataagaaa	cctccagaga	gtttaagcag	gggaataatt	tgatttgttt	6540
cttgtttgtg	atttttaaag	atcagtcctg	ttactgtgtg	taagacaata	atccagaaaa	6600
tctgttgctc	atgaaccaca	tatctgtaaa	tttgcttccc	ctgtaactgg	atctaaccaa	6660
caaaaattag	tacttactaa	gaaattacat	gcccagggac	tatgctaagt	aattcataaa	6720
cactattttaa	tttactcctc	acagcaagtt	tataagagaa	acgttattat	ttccacattt	6780
cggatgagaa	atttgaggct	tggggaaagt	taagtaattt	acctaattgc	acaccagtt	6840
cataagatgc	agagtttaaga	ttctaattct	gtgtctaaag	tgatgctcca	tcaaacacac	6900
cacqccctcca	actaggaagc	aacatgctgg	ccagaggatg	ctgtcatcaa	gtttacagaa	6960
tggttagatt	tctaggcaca	gatgaataaa	tcaacatgtt	ggtttgcaat	agaatgaatc	7020
tatccagctc	tgaatttgca	tccaagggtt	tgtgagcaca	caagtctaaa	agtgtggcct	7080
cagctctgct	aacttcacat	aggtgaatac	ctaggaggcc	accctctgag	accaccagat	7140
ggacagtcca	ccatctgttt	acagatggta	aagccacata	ccagctttgc	catctgatgt	7200
tctctattca	cattcaacat	ttatacaaga	aatagtcata	tggatccttt	tcaatagaca	7260
gtactgggga	aattgaattg	ccatatgcag	agaatggaa	ctagacctct	atctctcacc	7320
aaatacaaaa	gttaactcaa	gacagattaa	agacttacat	ataagacctg	taactacaaa	7380
aacactagaa	gaaaacctag	ggaaaatgct	tctggaatta	atctagggtga	agaactcagg	7440
actaagatat	caaaagcaca	agcaccacaa	caaaaataga	caaacaggac	ttaattaaac	7500
tagaagcgtt	ctgaacagca	agagaaataa	tcaatagagt	gaacagataa	tctgcagaat	7560
gggtgacaaat	atttgcaaac	tatgcatcct	acagggaat	aatgtccaga	atttgaagg	7620
aactcaaaaca	attcaacaac	aacagcaaaa	taaccccacc	aaaaaagtgg	gcaaaggaca	7680
tgaatagaca	tttttcaaaa	gaaggatat	gatatgggtt	ggctctgtgt	ctccaccag	7740
atctcacctt	aaattgtaat	aatccccaca	tatcatggga	gagacccggg	gggaggtaat	7800
tgaatcatgg	gggcagggtt	gtcccatgct	gttctcatga	tactgaataa	gtcctatgag	7860
atctgatgat	tttataaagg	ggagttcccc	tgcacacact	ctcttgcttg	cctccatgta	7920
atatgtgcct	ctgcttctcc	tttgcttctc	gccatgattg	tgaggcctct	ccagccatat	7980
ggaactgagt	caattaaacc	actttttctt	tgtaaattac	ccaatcttgg	gtatgtcttt	8040
attagcagca	taagaacaga	ctaatacagt	gtacaaatgg	ccaagaagcg	tacaaaaaac	8100

aaaatgctca	aatcactaat	cactagagaa	tgcgaagtta	aaaccacaat	gagatattat	8160
cttacagcag	tcagaatgcc	tattattaaa	acacccaaaa	ataacatggt	ggcaaggatg	8220
cagagaaaa	ggaatactta	cacattatta	gtgggaatgt	aaactagtac	agcttctgtg	8280
gaaaacacta	tggagatttc	tcaaagaact	agaaatagaa	ctaccatgtg	gttcagcaat	8340
accacaactg	ggtatctacc	caaagggaaa	taaattatta	tataaaaaag	atatctgcac	8400
tcacttggtt	attgcagcac	tattcacaa	agcaaagata	tggaaatcac	ccaagtgtcc	8460
atcaacagat	gattggataa	agaaaacgtg	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtat	8520
acacatacca	caatgaaata	ctattcagct	ataaagaaaa	gaatgaaatc	atgtcttttg	8580
cagcaatgtg	gttggaactg	gaggccatta	tcttaagtgg	ataattcaaa	aacagaaggt	8640
caaatgtcac	atgttctcac	ttataagtgg	gagctaaatg	atgtgtacac	atggacatag	8700
agtgtgggtat	gataaacact	ggagattgag	atgggtggaa	gggtggaagg	aggttgagtg	8760
atgagaaaa	actaaatgga	tacaatatat	atgattcagg	cgatagatac	actaaaagcc	8820
cagacttcac	cactacacag	tatagctatg	tagcaaaatt	gcacctgtat	tgcttaaat	8880
tatacaagta	aaaaaaagat	cgtaacgaat	ctgtttttta	ttctctatga	aattactacl	8940
gagagtatta	tccaatgccg	tttctatgca	gtgcccccaa	tattatccat	ttagcagctc	9000
ctatgcaatg	ccccaaagata	gaaattgtct	tcaactttta	ttccaggaaa	accttcagtc	9060
acacgtagaa	actagaaatt	tttcccctag	atgaaagtta	tgtaacataa	cacattatct	9120
tcattttagtc	ggtttccaag	aagctcagaa	ccagattttta	tgttcaatca	aaaactgctt	9180
attttaagt	aggtttactg	aggtataaat	tacaataaaa	gccacctttt	cgtgtatatt	9240
tctataagtt	ttggcaaatg	catagctgtg	taaccacaac	cacattcaag	atataggaca	9300
agtcctctcat	cctttaaagt	tcctttcttc	cccttccttc	accccagccc	ttggcaacca	9360
ctgggtttttg	tctgatccaa	tcgtttgcct	cttcttgaat	gtcatgtaaa	tagagccatg	9420
caatgtgaag	ccttttgagt	ctggctttgt	tcacttgttc	acttaggaga	atgcatttga	9480
gattcatctt	tgctgtttcg	tgtagcacta	gttcaactgtc	tattgttgag	tagtattcca	9540
ttgtgtggat	atgccacaga	ttgtttatct	agttaacaat	ttaaagccat	ttggtcattt	9600
ctaattttta	gctgctaaga	ataaagtgtc	tgtaagcttt	ccaatgcagg	ttttgtgtg	9660
aactcaggat	ttcatttcgc	ttgggtaaat	tcctagcttt	gggactgctg	agtcactctg	9720
taggtgtatg	ttgaacttta	taagaaactg	ccaaactgtt	ttccaaagtt	gctgtgctct	9780
tttgcactcc	catcagcagt	gaatgagggt	tcacttgcct	cgagcctagt	attttaactt	9840
cactatatac	cttctttgat	gacatatcct	ttcaaatttt	tggtcaagtt	tttattgggg	9900
tgttgttact	atggactgtg	agagttcctt	gtatattctg	catatgattt	ttttctcaca	9960
tttgtgtttt	atgaatatgt	tctcccaatg	tgtgctgcct	tttattttct	taacgtgcca	10020
tgtgaagagc	agaagtttta	ttttatgatg	ttccaaattat	ctttttttct	tttctttttt	10080
agatcaaaat	aggggtctat	tttgattacc	actgttattt	tatctccatt	tgattttcga	10140
tttttatttt	tatttttcta	atttcattgt	aaatttttaa	ttaaacccaa	atatcttagg	10200
ggaaagaggc	aagataaaaa	tagtctaact	tgggcataaa	tttttagagtc	atattctctt	10260
gccgagaaa	gaaactagct	ctcttacatt	gattgtttta	tttcagacgt	cactacttta	10320
tgaggatgcc	caaattatgg	gctttaaaaa	atatatatcc	aaacaggggt	tcagaaaagaa	10380
taactaattt	gtccacaaca	acacaaaaaa	tgattccacc	ataagtttgc	ccagtgcacg	10440
ggctatatatt	attttctata	tatcaaattc	tacaactggg	tctttaaagct	actgtacata	10500
agtcaggtta	aaatattagg	tattagttga	taagacattt	tatcatctat	gaaatgttgc	10560
ctgttgtcat	agttagagaa	tcttttaaaa	tatggagcta	ttttcataga	ttaaactatg	10620
ccagttaaaa	gttgggtaaa	aagaactaca	gaataatatt	tatgtttatc	gtgtaagggt	10680
ttaaagcaaa	ctccaagtca	ttttcatcaa	tgaaatcaat	aaggttttgc	aaatatatat	10740
gtatgaaaat	actgatttaa	aatgcaaata	aggggagagt	ttgagagaga	gagagagacc	10800
aaatgatttt	ataattctag	taagtttata	ggtttatggg	gtttttacgt	acttttctac	10860
ccaacttgct	tataagactt	taatgaatca	cttagaattt	ttaaaataat	ttattattac	10920
tctglacctg	ttcttlaact	tgcaaaatct	accttgccct	tttgtctaaa	agcaataaaa	10980
tctgacctgg	tttatatcgt	atcattgatt	ttgttactta	gcaagcacag	tgatccatta	11040
ggcctatgta	ggctcatggg	ttatacaaca	ctgccatctg	ctgacagagt	gtgacagtca	11100
cagtcagcaa	cacgagacca	ctttattttc	atttttagtg	tttatagaaa	tatgaatata	11160
cacaaatagt	ataatgaacc	ctaagcttca	caaatttaaca	ttttgtctaat	cttgtttcaa	11220
ctaccgcttc	ccccctcatc	caattactct	gttctctcac	ctcctcacac	acagacactg	11280
gcagtatttt	tcagccaatc	attaatacgt	tgccaactga	taaggacttt	taaaaaacaa	11340
ccaccatttc	attatgattc	ccagcataat	tgagagtaat	tccttaatat	ccaataccca	11400
ttttctattc	caatttcctt	gattgtcttt	aaactgtttt	taccctaagt	ttgcttaaat	11460
caaagtccag	gtcctgttaa	acatatgggt	aagttttacc	caaaccctaa	taaataaata	11520
aataaataaa	taaataacct	atttttttcca	atccagggga	atagtgaag	agggtaaatg	11580
ccattattta	gaaacataaa	tcacatcata	ggactagaat	tatcttgaag	tcaaaattga	11640
agactgaaaa	tggaaaagaa	aggtatagac	taaacttatt	taaaaacttc	aatgcagaac	11700

ES 2 720 186 T3

totaagagaa	gatattagaa	agttgtacca	gcattcatta	ttcagttatc	atcagttatc	11760
actcagctat	atgtagttga	aatctaacta	gaggagcttg	atcagataaa	gagatacatt	11820
tttctcacca	aggcggactc	tggaggcagg	tggttcagag	ctagacagct	gctgcaggac	11880
ccaggctcctt	tccttgccctg	ctcctccact	ctagcttggtg	actttcatcc	tgcaagatgg	11940
gtgtttctgc	caagttccag	atagaagaag	atagaacaca	aaggagaaat	aagcagtggg	12000
gcctctgtcc	atcaagcaaa	atttttccag	aatgcacaa	tagatttcag	atgatgtctc	12060
aacagtccta	actgcaaaga	agctgaggaa	ttagattttt	ggctgggaca	ctgttgccct	12120
gtaaaaaaat	tgggattctg	ttattaaaga	ataagaggag	ggaagaaaga	ttgaaaactc	12180
ctatgcaata	gtgaaaaaaa	taagaaaactc	aataaaaaag	tgggcatacc	ttaaaaacag	12240
gcaattcaca	acagatgaga	ccccaatagc	caataaaacat	ttttaaatgg	tcaacctcat	12300
gagtgatcag	aaaacacaaa	tatgtatttt	aaacccaaaa	taaaatacaa	tgtattgacc	12360
atttgagtgg	aaaaaaatta	aaaagcctga	taatatacag	tattggagag	gatgtagagt	12420
gaggaaaactc	catggaggac	ctatcattgc	aatgtggga	atgaaactta	atacacgaat	12480
ttgaggccaa	tttgtaaatt	gaaaaatgcg	cacaccctgc	aaccaagtac	cccttgcaat	12540
atttttgaaa	aqacaaaaac	gttatgtaaa	tggaaatcatg	caatatgtga	cccttatact	12600
cagcataatg	ccctcagat	ccattgaagt	ctgtgtgtatc	aacagctcac	tatttttttt	12660
ttaatTTTTT	ttagagacag	agtctcactc	tgtcacacag	ggtggagtgc	agtggcgaga	12720
tcataactct	ctctagcagc	ctcgaaactcc	tgggctcaag	cctcctcctg	cctcagcctc	12780
ccaagtagct	aggactacag	gcattgggaca	caacacacag	ctaatttttt	taaatTTTTT	12840
ttagagacat	ggtctcacta	tgttgccctac	gctggtctca	aactcctagg	tcaagcgatt	12900
ctcccacctc	tacttcacaa	agtgcgtgtg	gtatgtagggt	atggattgta	ggtatgaacc	12960
accgtgccca	actcactact	ttttattact	aattattcca	tgggatggat	gtaccgcagt	13020
ttgttttacc	attaatctat	tgtaggacat	tttgactgat	tccagtTTTT	ttttaataca	13080
aataaaaacca	ctatgaatag	ttgtgtattg	tatacgtttt	tgtgctaagt	tttcattttt	13140
ctgggataag	ttttcatttc	tttgggcttt	tactgtatcc	ttgatattat	aatatgttac	13200
atcttcagtt	ttattctatt	caatatataa	tcttttattt	tctttgaaat	ctcccattga	13260
ttgttttagaa	gtgtgtttgt	ttgtttccaa	gggtttggca	tttttcccat	tatttttcta	13320
ttatcgattt	ccagtttgat	tccaggtggt	cagagaaacac	acttcatgtg	acttcagttc	13380
tattaaattt	gttgagggtt	gttacatggc	ccagtatatg	gcaatttttg	tatatgttcc	13440
atgagcactt	gaaaagaatg	cgaattctgc	tgggtgctgt	tggagttttc	cagcaatggt	13500
gatttatgat	cttactcatt	gatggtgggt	ttgagtttga	lglgltctta	cgatggcagc	13560
tttaacattc	ttgtcaggta	attctaactg	ctctgtcatg	tcagtattag	cgcctcttaa	13620
ctgtctcatc	aaagctgaga	ttttcctggt	tccctggtt	cctggtggga	tgtgtgggtt	13680
tcatttgaaa	tctggacttt	ggagtattgt	gttatgaggc	tttggatctc	acttaaaactc	13740
atctcagcga	atttcctctc	ttgccactca	ggaaggagaa	gttgggtggt	tgaatggagc	13800
agagccgtta	ctgcctaaga	attgttttac	tgggcttccc	ctttctttct	cctttgacta	13860
gagagagcca	gctttttatt	agggttttat	gtttttctgg	gcctgttggg	gtttctgggt	13920
tgacaaactt	ctccagaacc	aagtctggaa	tggatgaggc	aaaaagaaac	cccgtggaat	13980
gcactgctgg	gtcgtcctt	gggtcccaat	gttccctaact	ggtctgcctt	ctctctcca	14040
gcttccagag	tcttcataag	tttgctttac	gtacaatgtc	cggggttttt	actttacttg	14100
agagaaatag	gtaaaagtaa	ttctactcca	tctttcagga	agcaaaagcc	cccttggtga	14160
ttttttttaa	ctttcaaaaa	caaaacaaaa	ggcagctgca	acagtaaaga	agctagtaac	14220
acccttggtg	ggaaattcaa	gtccaaatac	acatttttaag	tttggctagc	cagtgagaac	14280
atcagaatag	ttcagggtttt	aaacaaattt	atattttatga	ttatgcatat	actaaaagct	14340
gaaggcatct	tatattttact	aagcacctat	tttgttcttg	ttaaaaagac	agaattccat	14400
tccttaggaa	atttgacctg	gcagctggag	ctgatccacc	tggccactag	agcacagagc	14460
agggagagta	gtagccctgc	cccagccacc	cctcaagaca	ggattctttc	tctgggaact	14520
gtaggtaaca	ctaaatcgtt	ctggaacaca	acaacgaaag	aagaaaggaa	agagaaagaa	14580
agaaaggaa	aaagagagag	agaaggaaag	aagggaaggga	gggaaggaa	gaagggaag	14640
ggaagggaat	ggaagggaag	gaaggaaagga	aaaggaaagga	agggagggag	agagggagga	14700
aggaaggaaa	gaaaggaaag	gaaggaaagaa	ggaaggaaaa	aaagaaagaa	agaagaaaga	14760
aagaaagaca	agaaagaaag	aaagaaagaa	gaaaggggga	aagaaagaa	agaggaaaga	14820
aagagaaaga	aagaaagaa	agaaaggaaa	gaaagagaaa	gaaagaaaaa	gaaagagaaa	14880
gaaagagaaa	gacaagaaag	aaaaaggaaa	gaaagagaa	agaaagaaaa	gaaagaaagg	14940
aaagaaagag	aaagaaagaa	aaagaaagaa	agaaagaaag	aaagagaaag	aaagaaagaa	15000
aaagaaagaa	agaaagaaag	aaagaaaaag	aaaaagaaag	gagaaaatga	cagcaattac	15060
ttttgcaaca	acctaataata	agttttttta	aagttaaata	ttctgttcca	tgcattgctg	15120
gataccttat	aaataacagg	gcatectatg	acctgaattt	cccaaattat	gagttgaggg	15180
tttgaaactag	ttttaaaaaa	caaggaggcc	aggcgactg	gctcatgcct	gtaatcccag	15240
cactttggga	ggctgaggca	ggtggatcac	gaggtcagga	gctcgagacc	agccttacca	15300

```

acatagtgaac acaccgcctc tactaaaaat acaaaaatta gccgggcgtg atgggtgcgca 15360
cctgtaatctc cagctactca gcaggctgag gcaggagaat cgcttgaacc cagaaggcgg 15420
agglgacagl gagccaagat cacagcattg cactccagcc tgggcgacag agggagactc 15480
cgtcttcaaa aaaaaaaaaa aagacaagga atctgtaaaa caggcactgg aagtatatgc 15540
acttttattt tcattctatg ctatccgatg cctactgcta tttcccttca tattaacct 15600
ccaacagctg cattttgctc cctccagacc acctgattgg agctcacgtg ctcccacaca 15660
gtacctccaa ccagagagag tcgagtccca cagaaaggcg taacaatcac cagtaatttt 15720
gcacttattt tacattgtgc cttgatacag agtactcaat gaatgctott tgaatcatat 15780
ttaataaata tgtgtatttg ggattgtagc atattgcagc tacctggata tataatttaa 15840
ttagaaaaaa aattttgtgt ggctcaatca acaaacgact tttctctctc tctctttctc 15900
tttctccctc tctctctctt tcttctcagt tgatgttgct ggagttcagt gttgtgcaga 15960
tggcagtgac aaatgccatg ggcacatgag atatgataaa aggtccctga agaagggtgga 16020
gaaccagtta tcttatgaaa ttttccagag tgggtactgg atctctcctg tctggcacca 16080
tgctggcctc agcccaaggg gaatttcctt ccagagacag agggcagtgga ttgaggtggg 16140
gagacagatc gtaaacactga gacttacatg aggacacca acagaaaaaa ggtggcaagt 16200
atagaaaaat ctttctcttg gacagtcttc tctgttctaa cttcagcaaa attctcccc 16260
cagtggatgc tattgcacaa cctacatatg gctatgtttt ttctataca cacttaacca 16320
tgataaaaatg cattaattag tcacagtaag aggttaacaa caataactag taataaaata 16380
gaacaattca gtaaaataag agttacttga gcacaaacac taggatataca tgacagtcaa 16440
tctgatgacc aagagggcta ctaagcatct aaacaggagg gtaagtgtag acagcatgga 16500
gacgctggac aaagggatga ttcagtccca ggctggatg gagcggaagg gcatgatatg 16560
tcatcacgct actaaggcac acaattttaa atgagtaaat tcttattttc agaaattttc 16620
ttttaaatatt ttcagactac agttgcctac aggttaactga aacccagaa agcaaaattg 16680
ttgataagga ggtactactg tacatcgctc ttgaacca ctttatcatt tgctagtata 16740
tacatatata cctacataca tacatatata cactactaa tgtagaata agtttgctaa 16800
cacacacaca cagcacaca cacacactca catctactaa tgttagaata agtttgctaa 16860
ataagatgca caacttgta atgtcctaca gagcaataaa accataagca ttggggttat 16920
cttttctact agataaaaat ccattatcat ttccataaag ttttctttac attaacatct 16980
aacttttgca atctagtttt taatcatcat aaataggaag caaatgaact gtttctctag 17040
tgaatcaaat atccttgaaa acatacatag tcatcttttt ggtttatttt tatttttaga 17100
taaattattt aaagttttta ataatttaac attcacaata gtttgtgact gtatattttg 17160
acttggtcct tcaaaactta tttgtacttt tatgtatcgt gcttacctca attttttatt 17220
cacttttctt aaactttgct ggattggttt attatttttg tctattttct tctctcttag 17280
tggtttgga gggtttttta aatcccatta ctattgaatg cctattaact tgcccccttt 17340
ttctttcaat ctctattccc acggcctgaa gcatgagggc caagctgtct gtaaccagca 17400
gagagatgac ccaggtgtta ttccactctc cactgtccac ctatcaccat tcccagcccg 17460
atagctctga agtacggctt ttctggggct ctgtggggaa aactagaact ggctgtctca 17520
aggacacctc ctgttttttg aatggaaaaa atgtttctaa attccagttt ctctatgaat 17580
tcaatgacat ggttttaaate tctgtggtgt tcttcaaagt tttttctctt aataggacct 17640
ctcatgattc tccaaccacg aaataaattc attatcattt ttatatctct tctgtcattg 17700
caaaggaggt tttgaaagag tggaggacgc gctaattgaac tcaaaaaatc acactattcc 17760
tlgltlccal clgltlglca tlcatgtttt ccattggcct gtccgcctcc tctctctctt 17820
cttagacttg gagctctagc ctccagccag atagggaata gagagatcag actgttactt 17880
tgtctatgta gaaaagggaag acataagaaa ctccattttg atctgtatcc tgaacaattg 17940
ttttgctctg agatgctgtt aatctgtaac tttagcccca acctgtgtct cacagaaaca 18000
tgtgttgtat ggaatcaaga tttaagggat ctagggtgtg gcagaatgtg ccttggttaac 18060
aacatgttta caggcagtat gcttggtaaa agtcatcgcc attctccatt ctcgattaac 18120
taggggcaca gtgcactgcg gaaagccgca gggacctctg cccaggaaaa ctgggtattg 18180
tccaagggtt ctccccactg agacagcctg agatatggcc ttgcgggatg ggaaagatct 18240
gaccgtcccc cagcctgaca ccctggaagg gtctgcctg aggaggatta gtaaaagagg 18300
aaggcctctt gcggttgaga taagagggaag ccctctgtct cctgcatgcc cctgggaacg 18360
gcatgtctca gtgtaaaacc tgattgtaca ttcttctat tctgagatag gagaaaaccg 18420
ctctgtggct ggagggcgaga tatgtctggc gcaatgtctg tctgtgttct tttactacac 18480
tgagatgttt ggggtgagaga agcataaatc tgccctacgt gcacatccag gcatagtacc 18540
ttcccttgaa ttactttgtg acacagattc ctttgtctac atgttttctt gctgaccttc 18600
tccccactat caccctgttc tctgtccgca ttccctttgc tgaggtagtg aaaatagtaa 18660
tcaataaata ctgagggaac tcagagaccg gtgccagcgc gggtcctccg tatgtgtagt 18720
gacggtccct tgggcccact gttccttctc tatactttgt ctctgtgtct tatttctttt 18780
ctcagctctc cgtccacct gacgagaaat accacaggt gtggaggggc tggacacccc 18840
ttcgagccag gattatcagg gcatttgggg gtctgcaaaa ctaagcccca actcatcgat 18900

```

ttcacaactt	catccagagc	cagcctgaac	agtagttgcc	catgatttct	atgccttaat	18960
acgagaagag	aacatagggg	ctgggtgcc	agtagttaga	cagggagggc	agggaactct	19020
aagacagagc	ttgaggggct	cattcctctt	gcaaaatgaa	acaaaaacca	cagcactgaa	19080
tatgtaaatc	tgggtggctg	aacccctcct	aggatagtaa	gccctgacac	aattgctgct	19140
atcttctctt	tctctcaagg	aagtcaaaaa	acacctgcag	ccttactgtc	cccttggaat	19200
caagatgaac	atctacattt	tctaaagtgg	gacaagaatc	tctgttcata	tttatgtccc	19260
atgcatttgc	acgtggccgg	acaaaggact	ttgcttctgc	cagcacatct	gtcttcagat	19320
atgagaggaa	acagacacaa	cctggaggcg	gcaaaagaagc	agctcttctt	caagtgaact	19380
cctctatctc	cctacttctc	ggctaattgg	gcagccttga	tccttgggaa	tcaggacag	19440
atatccactc	gtgacaaaact	agctggaaga	atgacaacca	atcaggttcc	aagcaccact	19500
ggatgtgaac	cacagaatct	cctcctctcc	ttgtggaatg	tcagcttacg	tctgacaaaa	19560
aatgtaaaa	tgagagaggt	acaatcttaa	ggaggagtca	agctaaagca	gaaagaatca	19620
cctactctgg	actccagcat	gactgctgag	ctcaaataata	tatagagaga	gaaagaacca	19680
caaacttgaa	gatggatctc	agctacagac	ttccttgagt	caggtaggga	aatggccatc	19740
cctcaaacct	tgcaaaaggc	aaacttatgc	cattgtgtcc	tctgacatac	tgggtgatgt	19800
actgtatgtt	actgatgtga	ggggaacttc	ctaaattggc	tagtaaatta	tgccaaataa	19860
aaagcaaaaa	tgatatttct	tgaaatgtta	catctgagga	acattgctaa	aataatttat	19920
cagtagtttt	caggatgatt	tatagatgtg	cattgaagtg	tgtaattgtg	ctctctctct	19980
cctctctctc	tctctttctc	tctctctctc	cgctctttct	ctccttgccc	ccctccctcc	20040
ctgaactttc	ttcctgtccc	ctccacagca	gtttatattt	ttttctgat	aattctaact	20100
tgctgagggg	tcaatgtaaa	gcaccttcag	tgatgagtta	gttggaatgt	tccccaagaa	20160
attctatttc	cagcactctt	ttacatgaaa	tccaagaagc	tctcagacta	tcttactgac	20220
accttgccct	tcctcaacag	atcaatctta	tcaatgtcca	tcacagatat	tttgtagaac	20280
gggtggatct	ggcagagtct	cacagatgct	tctgagacaa	catttgcttt	caaaaaatga	20340
accacacaca	tcctaaagat	ctcagccact	tcccatgttt	cattttgtgt	tacagcaaac	20400
atcacaacaa	tcattcctac	agatcaccac	tgcatgtgat	caataaaaata	gtttttgcaa	20460
caatgggtact	tatgataatc	atcttttatt	gtttacaaat	actgctttac	aatagttatt	20520
cgggttgcact	gttcatatta	gattttccat	tagctcactt	aggaacataa	gtccctcgaa	20580
cagctcagtc	atctttttca	ttcctgtttc	tatcccttac	atctctttcc	tttgagagcg	20640
actatctcct	acactgaaac	aggaaagctt	ttaccttttt	ggcatgcttg	atttaaagat	20700
tatagaaaag	tatttgacaa	agaaaactca	cacatgtgtg	tacatatctt	ttaaaaagtt	20760
atgtttatgc	attgcacagg	aatatcgaga	atgctaatag	gcaatgtcag	agtttactgt	20820
ttttcaaaa	tagtacagtt	ttattatttc	taaaaactat	aaaatgaata	tattcacatc	20880
accatacaga	agagtagggg	gagatggcat	aaagtgtcat	tgttcctcct	ctgcaatccc	20940
aggagataac	taccaagcac	aatttatgtc	ttttaaaatt	cagcccgat	ttatatacat	21000
atatattcaa	tgtagatggg	atcatgatat	ctcaccacac	atactcttca	gtgacctgca	21060
ttttcacaaa	caccttcac	gtaactatat	agaagtctac	gtcttccctc	taatgtctgc	21120
tttgtgctac	attgtaaaagc	tctagcacag	tttaacccaa	ctcctattaa	tgaggatttt	21180
agttattttt	cactctttta	acaatatttc	cttagttagt	cttatacata	cgtctgtaca	21240
cacttatccc	agtctaagga	gttcctttta	ccttccccca	tcccagcatt	ccctgtcagc	21300
cttggtgctt	cggttgagtg	actttactcc	tggagtataa	tctgcgtata	gttcagttaa	21360
aaacatggga	tctgagttta	ggtcacagct	ctgccactta	ctgccataag	ccagttcctt	21420
gacctctctg	cctcaaggtt	tttgaccta	caaagtaggg	gataatatta	gttcctagtt	21480
catagagtct	tgggaataat	taaatgtgat	gatccatgta	caatgtctgg	cacttagtaa	21540
gtgctcaata	aatgtcacc	tttatgattg	gtattgcgtg	tatgtctgca	gagaaaatca	21600
ctttgtgtcc	cctttaaaaa	aggactatgc	ccttggtcag	ctattttgca	cattaaattt	21660
cacttgccaa	tattaactct	ccacctctaa	cttgatccct	ctccttccct	atcttctggt	21720
gagaccaaat	gctaattctg	ctattcaagg	caactagcaa	agctgccagt	gacagaatca	21780
aataaaccta	ccctaatctt	ttagaattgt	agttatgatt	tctgttgtaa	aagttactgt	21840
tgtggcagtc	agtattagtc	tttggcttat	gatagcatct	ctgatctatt	attgaytttc	21900
aattakgtat	ttttttttat	ttattctgaa	aatgtttgtt	aagcatttgc	taagtaaaaga	21960
tactggackg	agcctcccaa	atacagggca	aataaaacat	caaacagctt	ataatttaga	22020
agggtagaag	agaatctgaa	agcaggtaaa	aataaacagg	cactcggctg	ggcgcggtgg	22080
ctcacgcctg	taattcccagc	actttggggg	gccgaggtgg	gcggatcacg	aggtcaggag	22140
atcgagacca	tcttggttaa	cacgggtgaa	ccccgtctct	actaaaaata	caaaaaatta	22200
gcgaggcggtg	gtggcgggcg	ccttttagtcc	cagctagtgc	ggaggctgag	gcaggagaat	22260
gggtgtgaacc	cgggaggcg	agcttgcagt	gagccaagat	cgcaccactg	cactccagcc	22320
tgggygacag	agcgagactc	cgtctcaaaa	aaaataaata	aataaaataa	aaaataatta	22380
ggLacLctag	gccagtgac	ctgtctctgt	actctgtaaa	ttcaggtcac	ctgctcaggg	22440
ctaactctgag	agaaggctct	tcttcagttg	aattttgaaa	gacaattagc	agttccacaag	22500

ES 2 720 186 T3

ctaaccacagg tggacaaaga tgttcccaag cagagggaggt gcttgtgaaa gctggaggcc 22560
 atagaaaaac tctaaggagt gtagggaggt gggagtaatg tatggaagggt gtggagatgg 22620
 aaggtaaga gagatacaag gctgcaaaaaa tggagctgga ctcaaaagaa aatactgaaa 22680
 aggtcttcag tgttggtgat gagattacta tggaaacact atggaacact gggactccat 22740
 ggcagctcca aagatggcat gcgcctggtc cagctcagta agagctgagc tcttcctgtg 22800

<210> 159
 <211> 154
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 159

tctggcaaca cggcctccct gaccgtctct gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
 tactgcagct catatgcagg cagcaacaat ttaagtcttc ggaactggga ccaagggtcac 120
 cgtcctaggt cagcccaagt ccactccac tctc 154

<210> 160
 <211> 156
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 160

tcagggacaa tggccacctt gactatcagt ggggcccagg tggaggatga agctgactac 60
 tactgttact caacagacag cagtggtaat cattatgtct tcggaactgg gaccaagggtc 120
 accgtcctag gtcagcccaa gtccactccc actctc 156

<210> 161
 <211> 150
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 161

tctgggaaca cagccactct gaccatcagc gggacccagg ctatggatga ggctgactat 60
 tactgtcagg cgtgggacag cagcactgcc gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcacogtc 120
 ctaggtcagc ccaagtccac tcccactctc 150

<210> 162
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 162

aggtggaaac acggtgagag t 21

<210> 163

<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> sintética

 <400> 163
 ccactcgggg aaaagttgga a 21

10

REIVINDICACIONES

1. Un ratón que comprende:

- 5 (a) uno o más segmentos génicos V λ humanos no reordenados y uno o más segmentos génicos J λ humanos no reordenados en un locus de cadena ligera kappa de inmunoglobulina endógeno del ratón, en donde el locus de cadena ligera kappa de inmunoglobulina comprende una región C κ de ratón;
- (b) uno o más segmentos génicos V H humanos, uno o más segmentos génicos D H humanos y uno o más segmentos génicos J H humanos en un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno del ratón; y
- 10 (c) una modificación de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina, en donde la modificación elimina la función de ADAM6 endógena, que está asociada con una reducción de la fertilidad en ratones macho, comprendiendo el ratón además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6a de ratón o un ortólogo u homólogo o fragmento funcional de la misma, cada uno de los cuales es funcional para mejorar o restaurar dicha
- 15 reducción de la fertilidad en un ratón macho, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6b de ratón, o un ortólogo u homólogo o fragmento funcional de la misma, cada uno de los cuales es funcional para mejorar o restaurar dicha reducción de la fertilidad en un ratón macho, en donde las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas de ADAM6, ortólogos, homólogos o fragmentos funcionales de las mismas está presentes en los segmentos génicos de cadena pesada humanos.

20 2. El ratón de la reivindicación precedente, en donde el ratón comprende de 12 a 40 segmentos génicos V λ humanos y al menos un segmento génico J λ humano.

3. El ratón de la reivindicación 2, en donde:

- 25 (a) el ratón comprende 12 segmentos génicos V λ humanos y al menos un segmento génico J λ humano;
- (b) el ratón comprende 28 segmentos génicos V λ humanos y al menos un segmento génico J λ humano; o
- (c) el ratón comprende 40 segmentos génicos V λ humanos y al menos un segmento génico J λ humano.

30 4. El ratón de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:

- (a) el al menos un segmento génico J λ humano se selecciona de J λ 1, J λ 2, J λ 3, J λ 7 y una combinación de los mismos; y/o
- (b) el ratón comprende al menos cuatro segmentos génicos J λ humanos.

35 5. El ratón de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el ratón carece de una región variable de cadena ligera kappa endógena en el locus de cadena ligera kappa de inmunoglobulina endógeno.

6. El ratón de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una región intergénica V κ -J κ humana de un locus de cadena ligera κ humano, en donde la región intergénica V κ -J κ humana es contigua con uno o más segmentos génicos V λ no reordenados y con uno o más segmentos génicos J λ no reordenados, preferentemente donde la región intergénica V κ -J κ humana se sitúa entre un segmento génico V λ y un segmento génico J λ , y en donde la región intergénica V κ -J κ humana comprende la SEQ ID NO: 158.

7. El ratón de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un ratón macho.

8. Una célula o tejido aislado del ratón de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

9. Uso del ratón según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para realizar:

- 50 (i) un anticuerpo quimérico inverso;
- (ii) un anticuerpo completamente humano;
- (iii) un fragmento Fab completamente humano; o
- (iv) un fragmento F(ab)₂ completamente humano.

55 10. Un método para realizar un anticuerpo, comprendiendo el método:

- (a) exponer el ratón según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 a un antígeno;
- (b) permitir que el ratón desarrolle una respuesta inmunitaria a un antígeno; y
- 60 (c) aislar del ratón de (b) un anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera procedente de una región hV λ , una hJ λ y la C κ de ratón, o aislar del ratón de (b) una célula que comprende un dominio de inmunoglobulina que reconoce específicamente el antígeno, o identificar en el ratón de (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o ligera que se une con el antígeno.

65 11. Un método para realizar un anticuerpo humano, comprendiendo el método exponer el ratón según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 a un antígeno, permitir que el ratón monte una respuesta inmunitaria que comprende

- realizar un anticuerpo que se une específicamente con el antígeno, identificar en un linfocito B del ratón una secuencia de ácido nucleico reordenada que codifica un dominio variable de cadena pesada humana y una secuencia de ácido nucleico reordenada que codifica una secuencia de dominio variable de cadena ligera humana afín de un anticuerpo, en donde el anticuerpo se une específicamente con el antígeno y emplear las secuencias de ácido nucleico que
- 5 codifican los dominios variables de cadena pesada humana y variables de cadena ligera humana ligados, respectivamente, a una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio constante de cadena pesada humana, y una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio constante de cadena ligera humana para realizar un anticuerpo deseado.
- 10 12. Un método para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o ligera que comprende:
- (a) exponer el ratón según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 a un antígeno;
- (b) identificar en un linfocito B del ratón:
- 15 (i) un gen de inmunoglobulina de cadena ligera reordenado, en donde el gen de inmunoglobulina de cadena ligera reordenado comprende al menos un segmento génico de región variable de cadena ligera λ humano ligado a una región C κ de ratón; o
- (ii) un gen de inmunoglobulina de cadena ligera reordenado de (b)(i) y un gen de inmunoglobulina de cadena
- 20 pesada reordenado, en donde el gen de inmunoglobulina de cadena pesada reordenado codifica una cadena pesada que se empareja con la cadena ligera codificada por el gen de inmunoglobulina de cadena ligera reordenado de (b)(i); y
- (c) clonar una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o ligera del linfocito
- 25 B del ratón, en donde el dominio variable de cadena pesada y/o ligera es de un anticuerpo que comprende un V λ humano y un C κ de ratón.

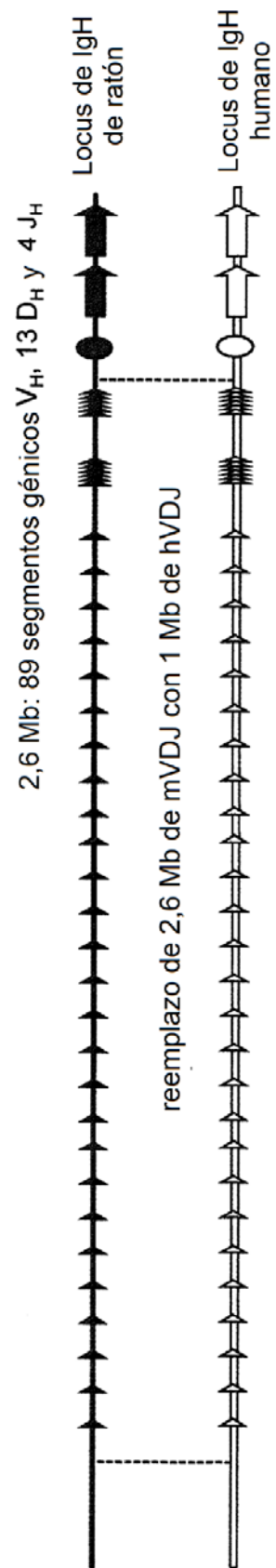


FIG. 1A

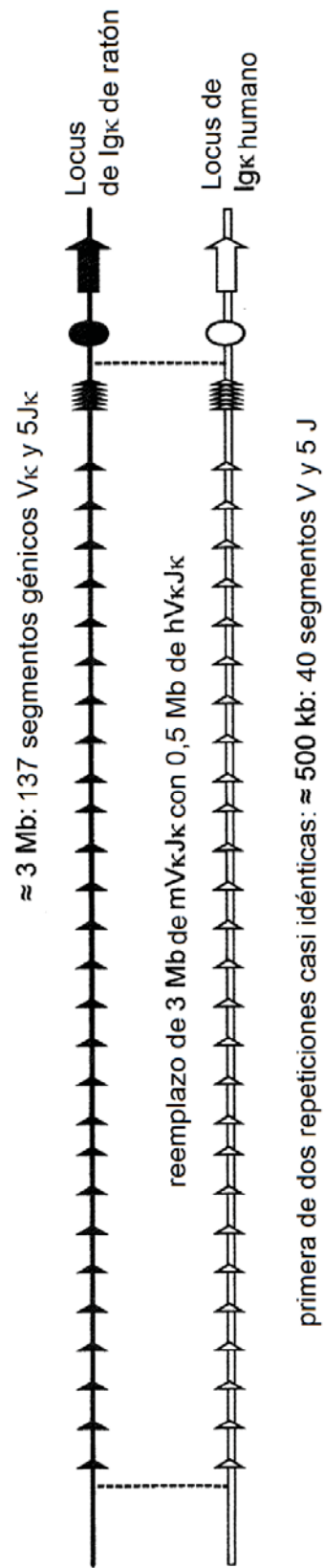


FIG. 1B

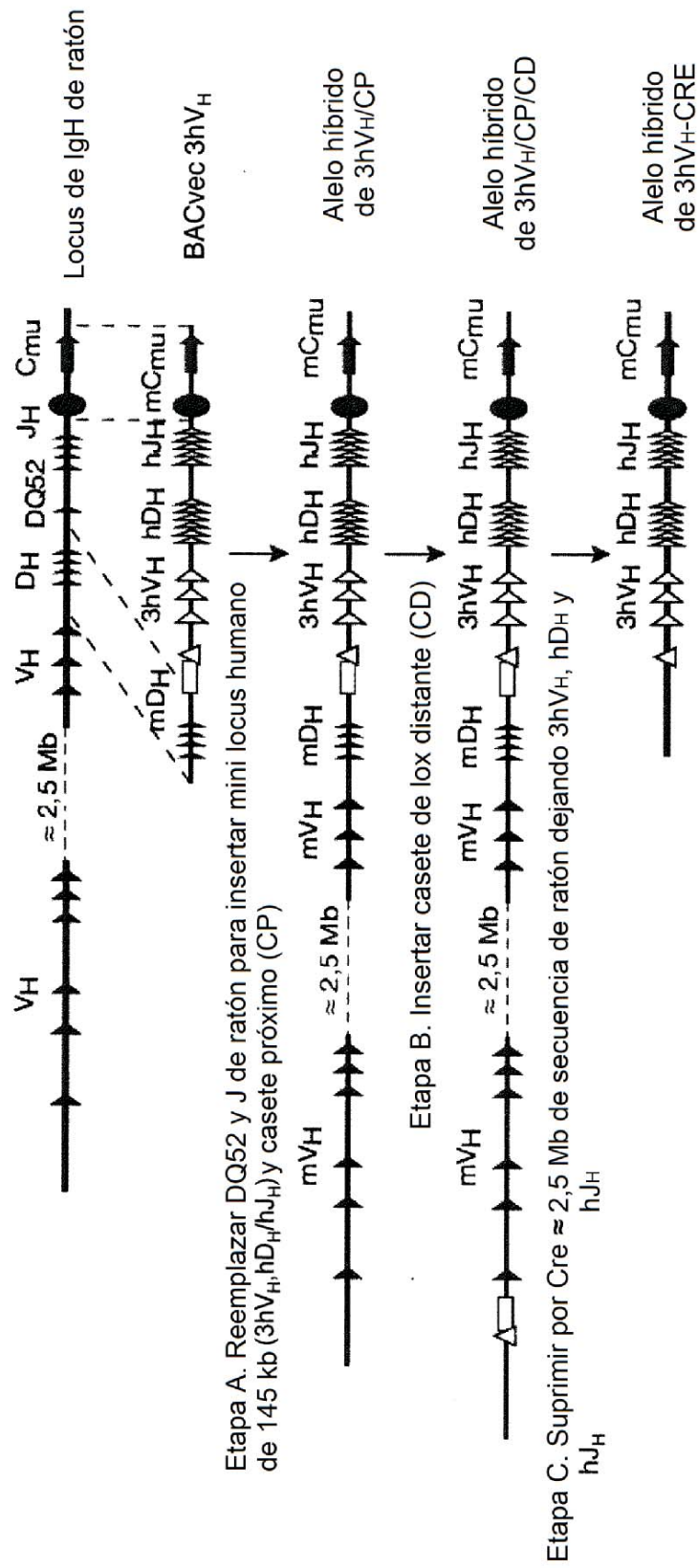


FIG. 2A

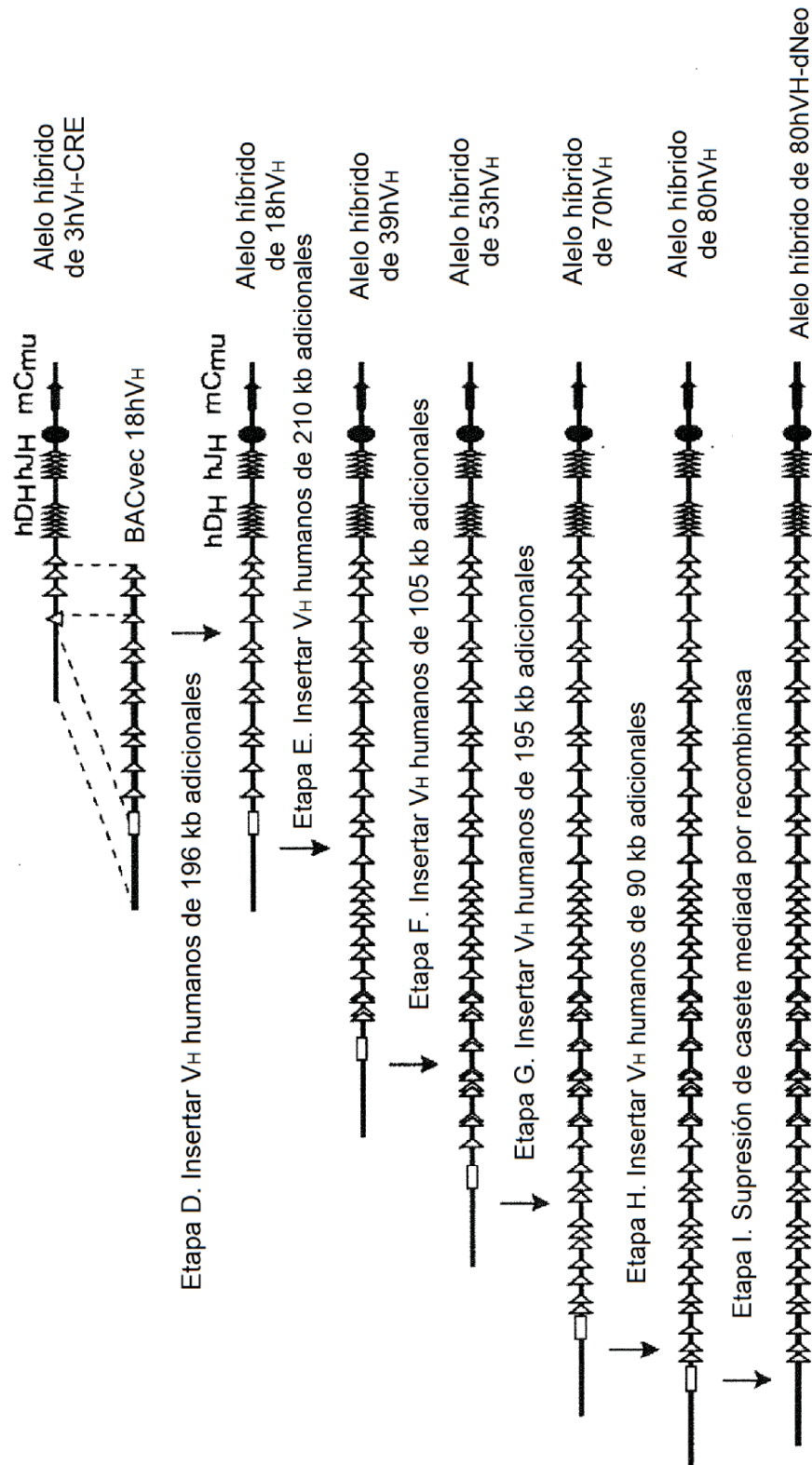


FIG. 2B

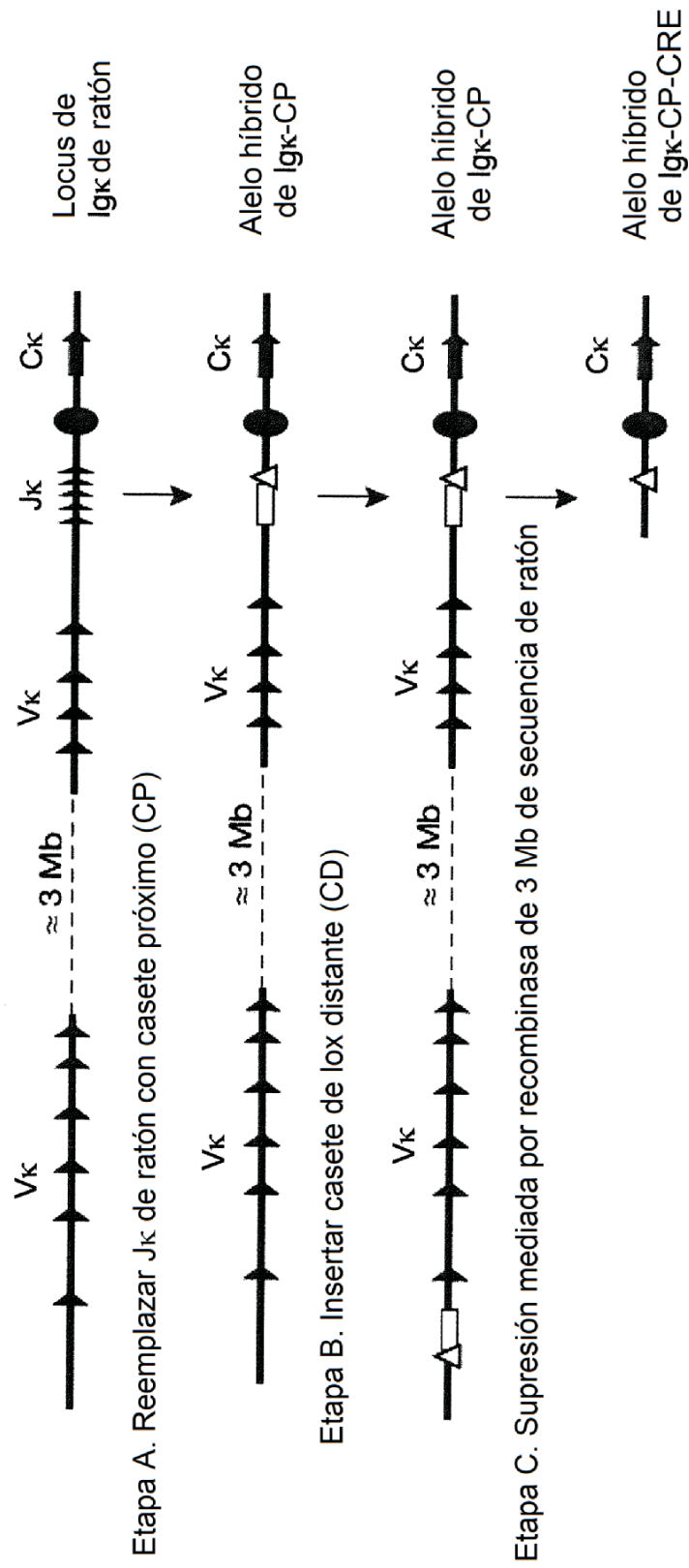


FIG. 2C

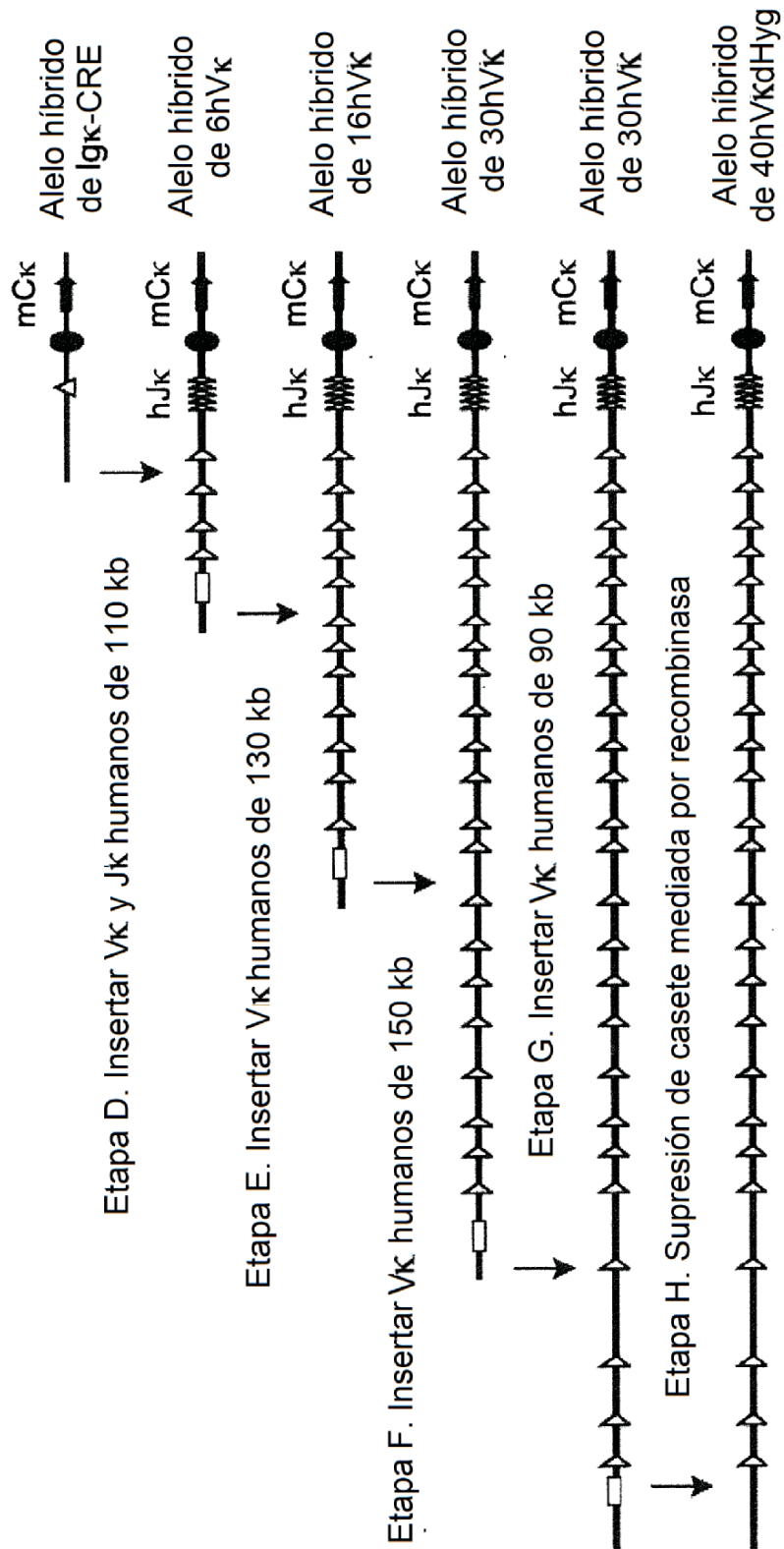


FIG. 2D

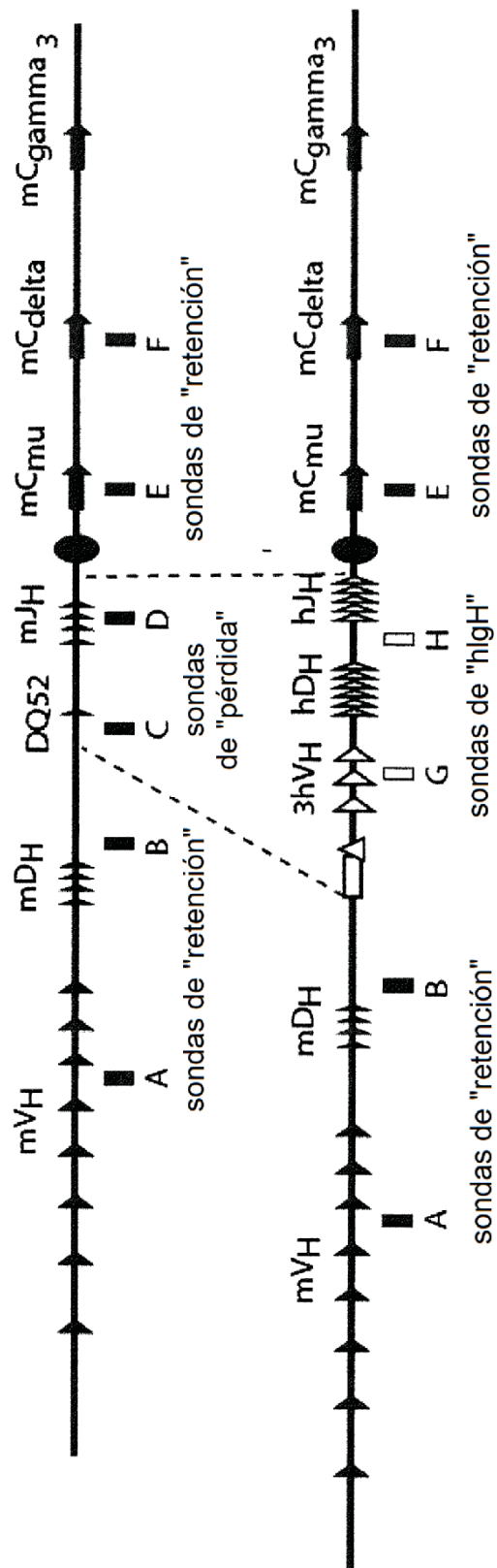


FIG. 3A

		A	B	C	D	E	F	G	H
ES parental	Número de copias teórico	2	2	2	2	2	2	0	0
	Número de copias observado	1,9	1,8	2,1	1,8	1,9	1,8	<0,01	<0,04
ES modificada	Número de copias teórico	2	2	1	1	2	2	1	1
	Número de copias observado	1,9	2,4	1,0	1,0	2,0	1,9	+	+

FIG. 3B

	número de copias	D	H
Ratones TS	Teórico	2	0
	Observado 1	1,71	< 0,01
	Observado 2	2,07	< 0,01
	Observado 3	2,16	< 0,01
	Observado 4	1,88	< 0,01
Ratones Het	Teórico	1	1
	Observado 1	1,22	1,04
	Observado 2	0,94	1,02
	Observado 3	0,85	0,95
	Observado 4	1,02	1,00
Ratones Homo	Teórico	0	2
	Observado 1	< 0,01	2,37
	Observado 2	< 0,01	2,22
	Observado 3	< 0,01	2,43
	Observado 4	< 0,01	1,93

FIG. 3C

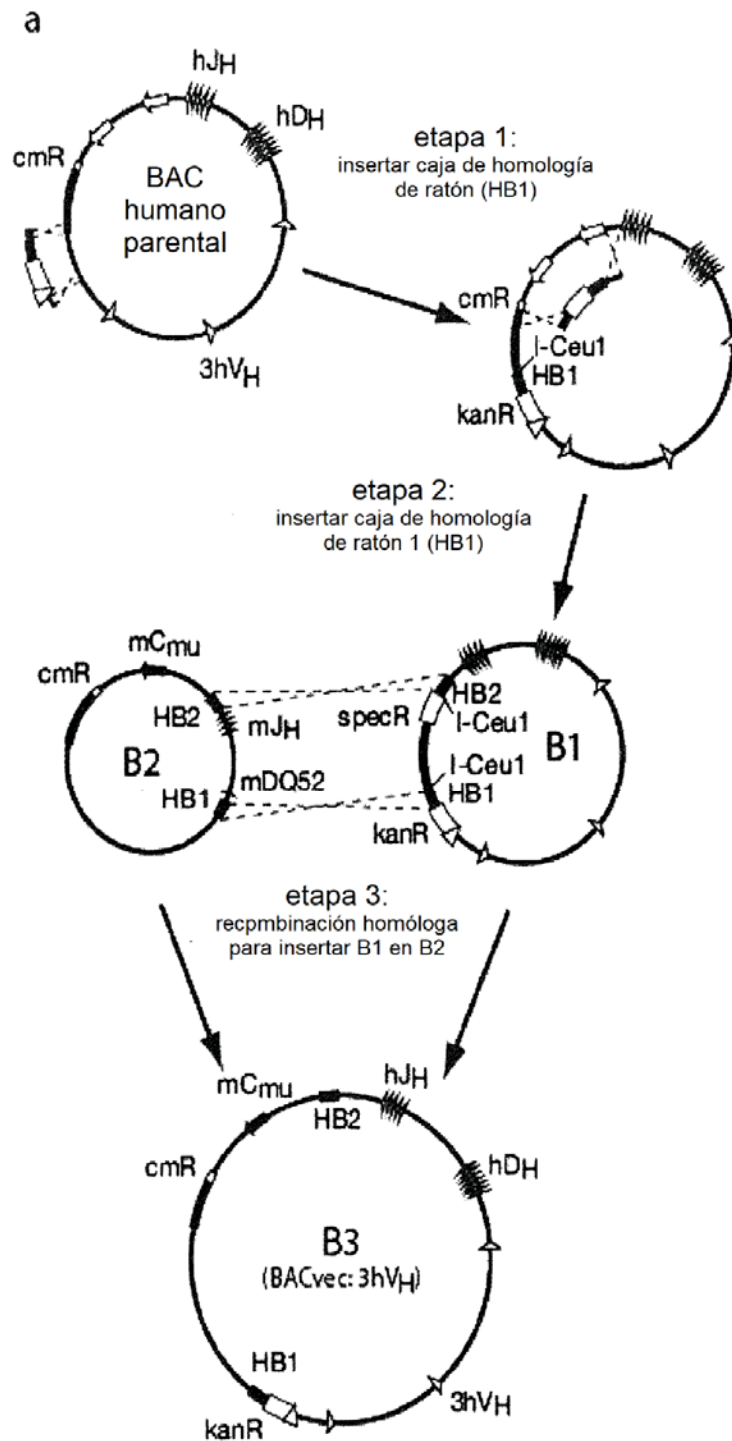


FIG. 4A

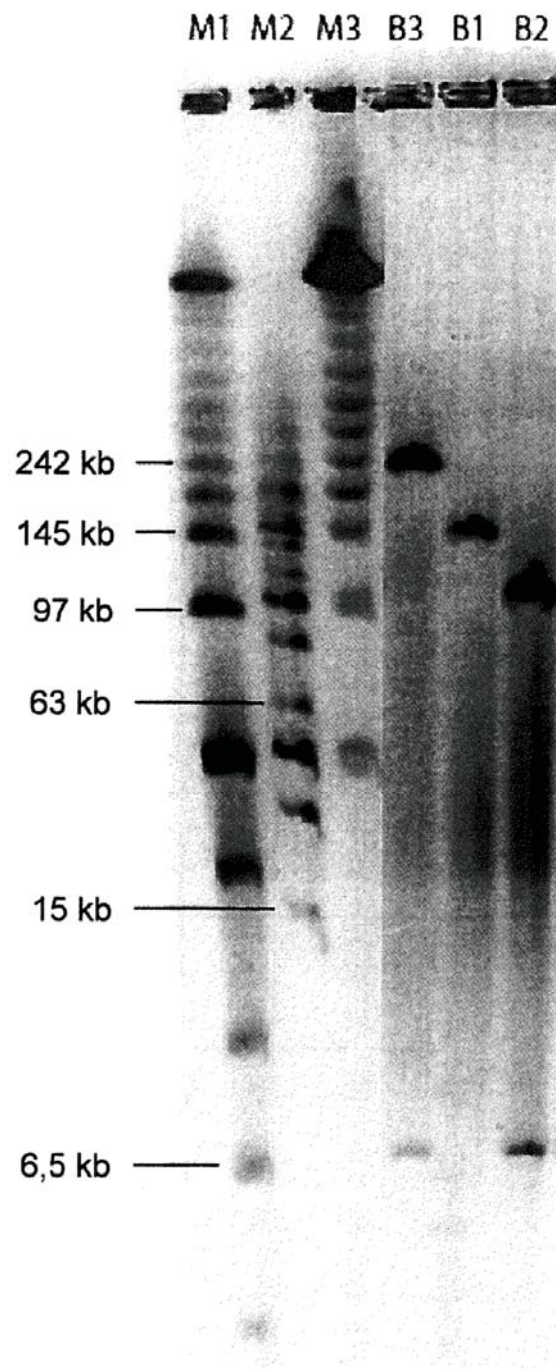


FIG. 4B

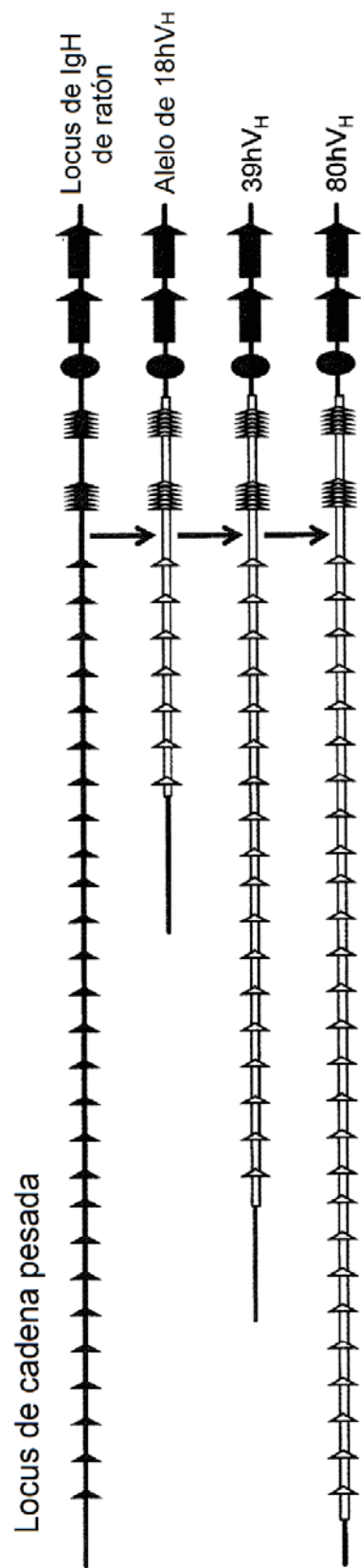


FIG. 5A

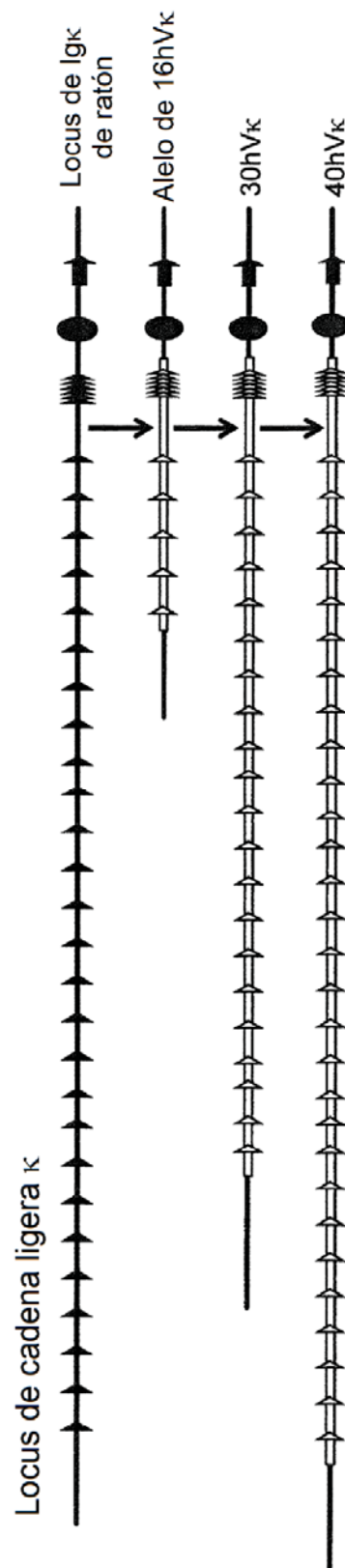


FIG. 5B

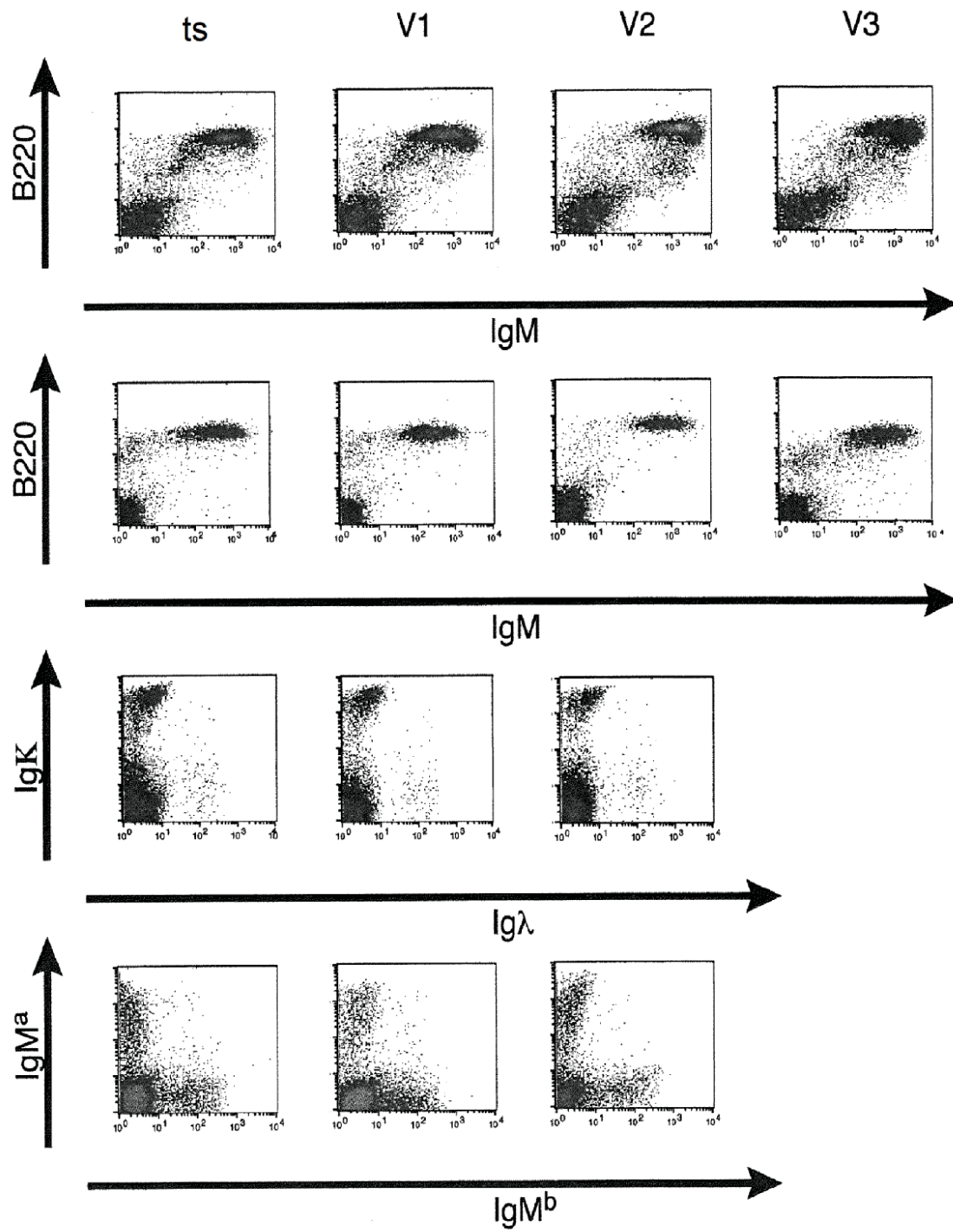


FIG. 6

3'V _H	N	D _H	N	5'J _H
(3-72) GCTAG	(D _H 1-26)	GGTATAGTGGGAGCTACTAC	AGGC	CTTTTGATATC (3)
(3-9) GCAAAAG	CCCAGGGG	TACTGGGgcCTAC	ACCT	ATGCTTTTGGATATC (3)
(3-7) GCGAGAGA	G	AGTGGGAGCTACTAC	GAGG	ACTTTGATATC (4)
(4-59) GCGAGAG	GGAC	GGTATAGTGGGaaCTACT	CCT	CTTTGACTAC (4)
(3-23) GCGAAA	CC	AGTGGGAGC	C	CTGGTTGACCCCC (5)
		TAGTGGGAGCTACT		
(4-34) GCGAGAGG	(D _H 1-7)	GGTATAACTGGAACCTAC	CGA	ATGCTTTTGGATATC (3)
(1-2) GCGAGAG	AGGAG	GGTATAACTGGAACCT		ACTACTTTTGACTAC (4)
(3-23) GCGAAAGA	GA	TATAACTGGA	TGG	TACTTTTGACTAC (4)
(3-7) GCGAGAGA	G	GTATAACTGGAACCAC	CCC	CTTTGACTAC (4)
(4-59) GCGAG	GGGA	ATAACTGGAAC	TTTCTTTT	TTTGACTAC (4)
(4-39) GCGAGA	GG	TATAACTGGAACCT	CTCTGGG	CTTTGACTAC (4)
		TAACTGGAACCT		
(3-30) GCGA	(D _H 3-10)	GTATTACTATGGTTCGGGGAGTTATTATAAC	CTC	TTGACTAC (4)
(1-2) GCGAGAGA	AAAGGGC	TACTATGGTTCGGGGAG	GAAGGT	CTACGGTATGGACGTC (6)
		TATTACTATGGTTCGGGGAGTTATTATAAC		
(1-2) GCGAGAGA	(D _H 6-6)	GAGTATAGCAGCTCGTCC		
(3-48) GCGAGA	GA	GTATAGCAG		CTTTTGACTAC (4)
(3-13) GCAAGAGA	GG	GAGTATAGCAGCTCGT	TG	TGACTAC (4)
		ATAGGAGCTCGcCC	CTCGGG	TACTTTGACTAC (4)
(3-7) GCGAGAGA	(D _H 7-27)	CTAACTGGGGA		
(3-15) ACCAC	TCT	TGGGGA	AGG	CTAC (4)
(3-48) GCGAGA	CCA	TAACTGGGGA	GGG	TTTGACTAC (4)
	GATA	GGGGA		CCg (5)

FIG. 7A

3'Vκ	N	5' Jκ
(1-6) CAACAGAGTTATAGTACCCCTCC	GGA	GACG(1)
(1-9) CAACAGCTTAATAGTTACCCCTC		GGACG(1)
(1-9) CAACAGCTTAATAGTTACCC		ATTCACT(3)
(1-9) CAACATtTTAATAGTTACCC		GCTCACT(4)
(3-15) CAGCAGTATAATAACTGGCCCTC		TCACCT(4)
(1-17) CTACAGCATAAATAGTTACCC		GTGGACG(1)
(1-17) CTACAGCATAAATAGTTACCCCTC		GGACG(1)
(3-20) CAGCAGTATGGTAGCTCACCTC		GGACG(1)
(2-30) ATGCAAGGTACACACTGGCC		GTGGACG(1)
(2-30) ATGCAAGGTtCACACTGGCC		GTACACT(2)
(2-30) ATGCAAGGTACACACTGGCC		GCTCACT(4)
(1-33) CAACAGTATGATAAATCTCCCTCC		CACT(3)
(1-33) CAACAGTATGATAAATCTCCCTCC		ATTCACT(3)
(1-33) CAACAGTATGATAAATCTCCCTCC	CG	TCACCT(4)
(1-33) CAACAGTATGATAAATCTCCCTCC		GATCACCT(5)
(1-37) CAACGGAtTTACAATGCC	GA	CACCT(5)
(1-39) CAACAGAGTTACAGTACCCCTCC	CA	TGTACACT(2)
(1-39) CAACAGAGTTACAGTACCCCTCC		TCACCT(4)
(1-39) CAACAGAGTTACAGTACTtCCTCC		CACT(4)

FIG. 7B

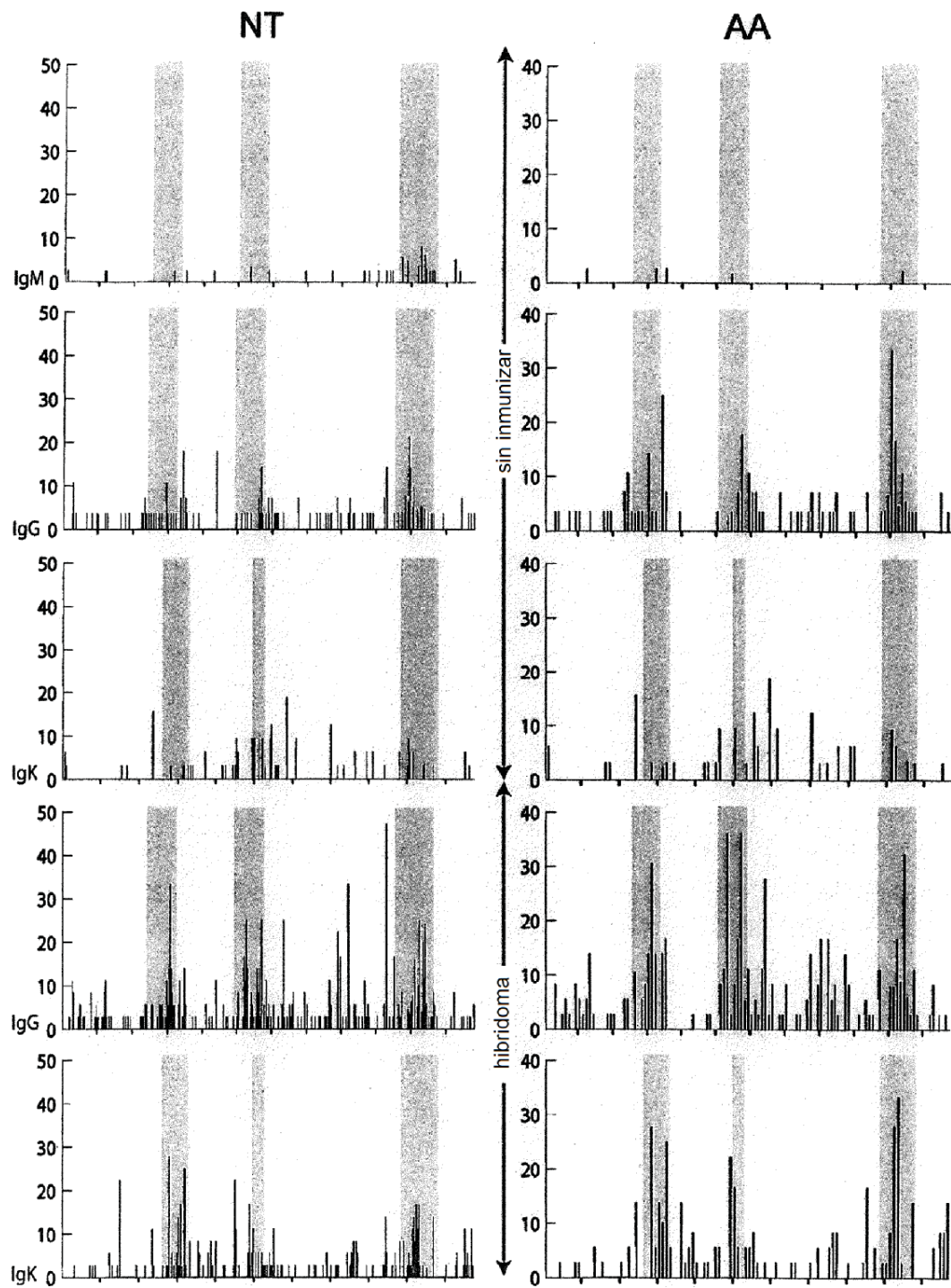


FIG. 8

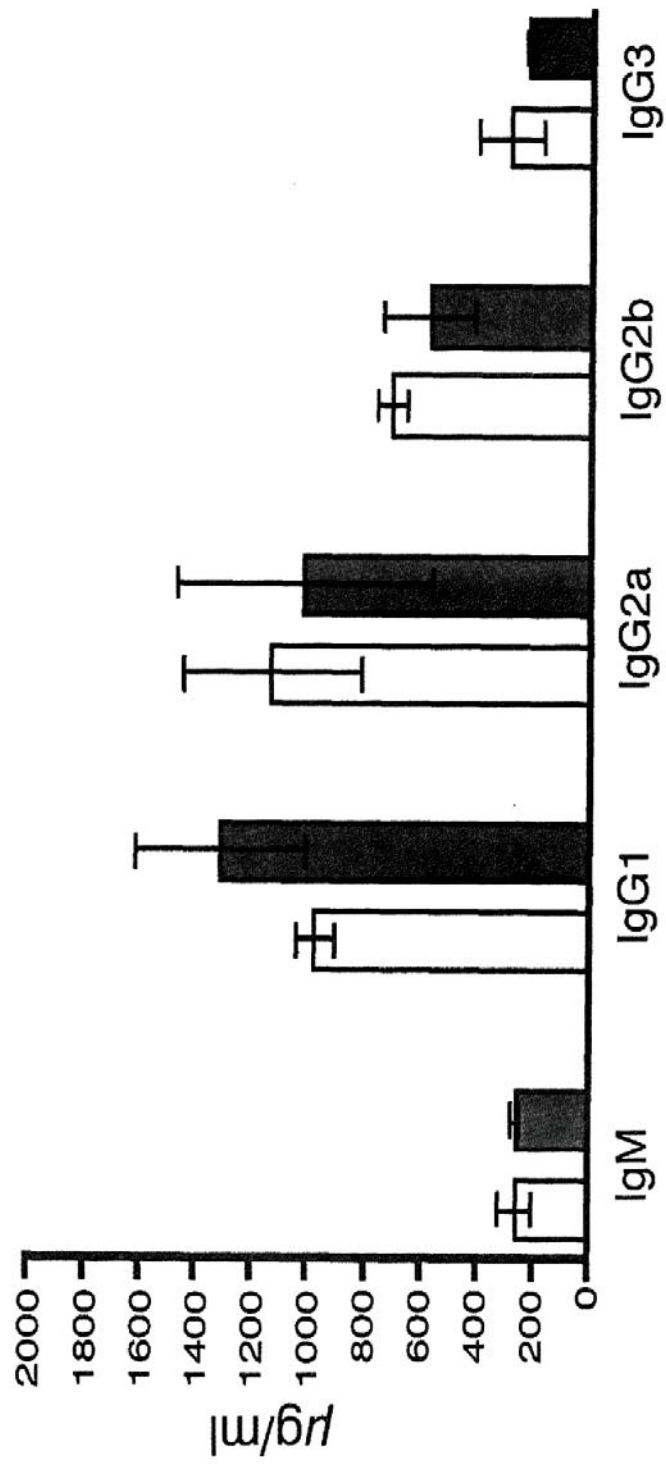


FIG. 9A

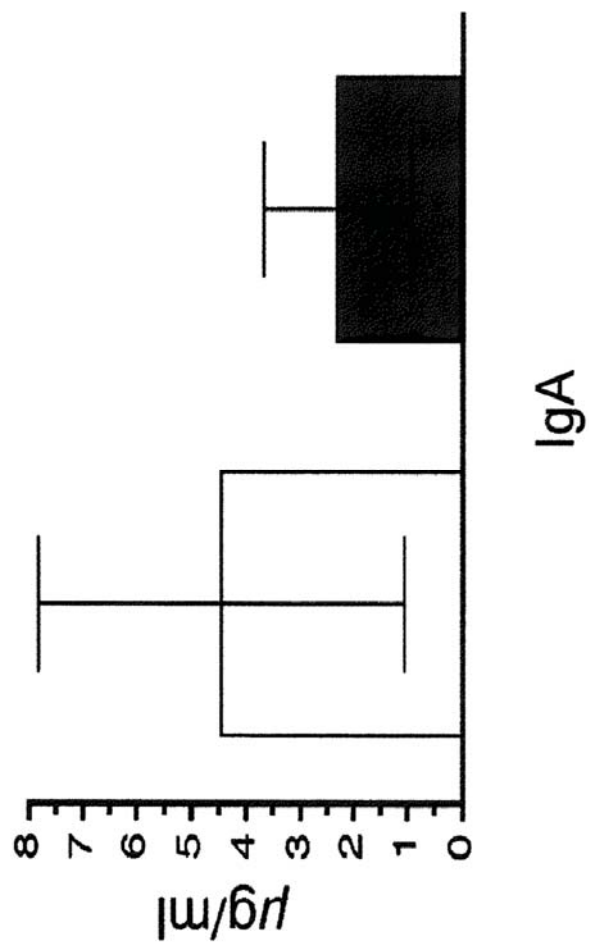


FIG. 9B

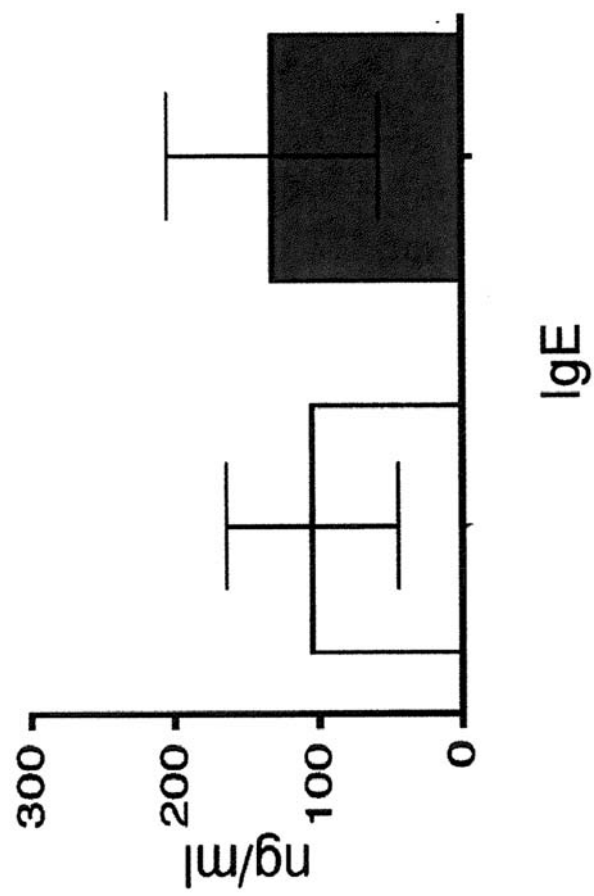


FIG. 9C

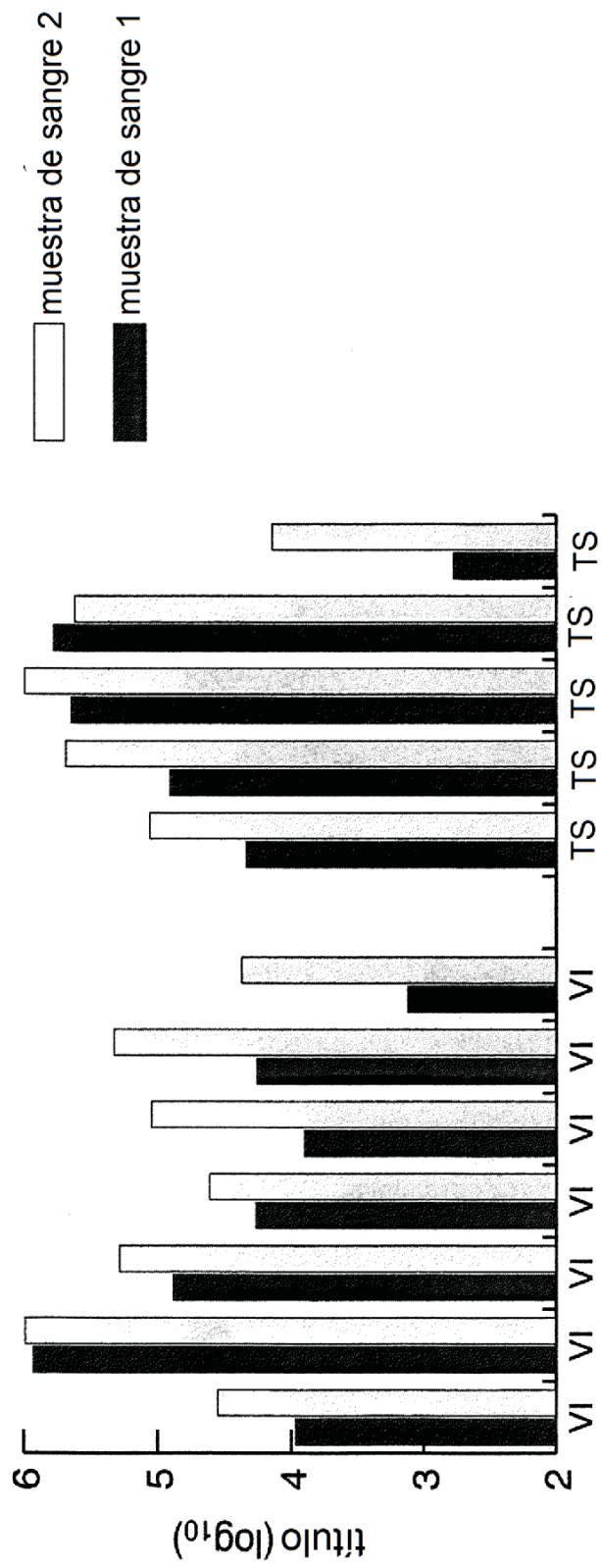


FIG. 10A

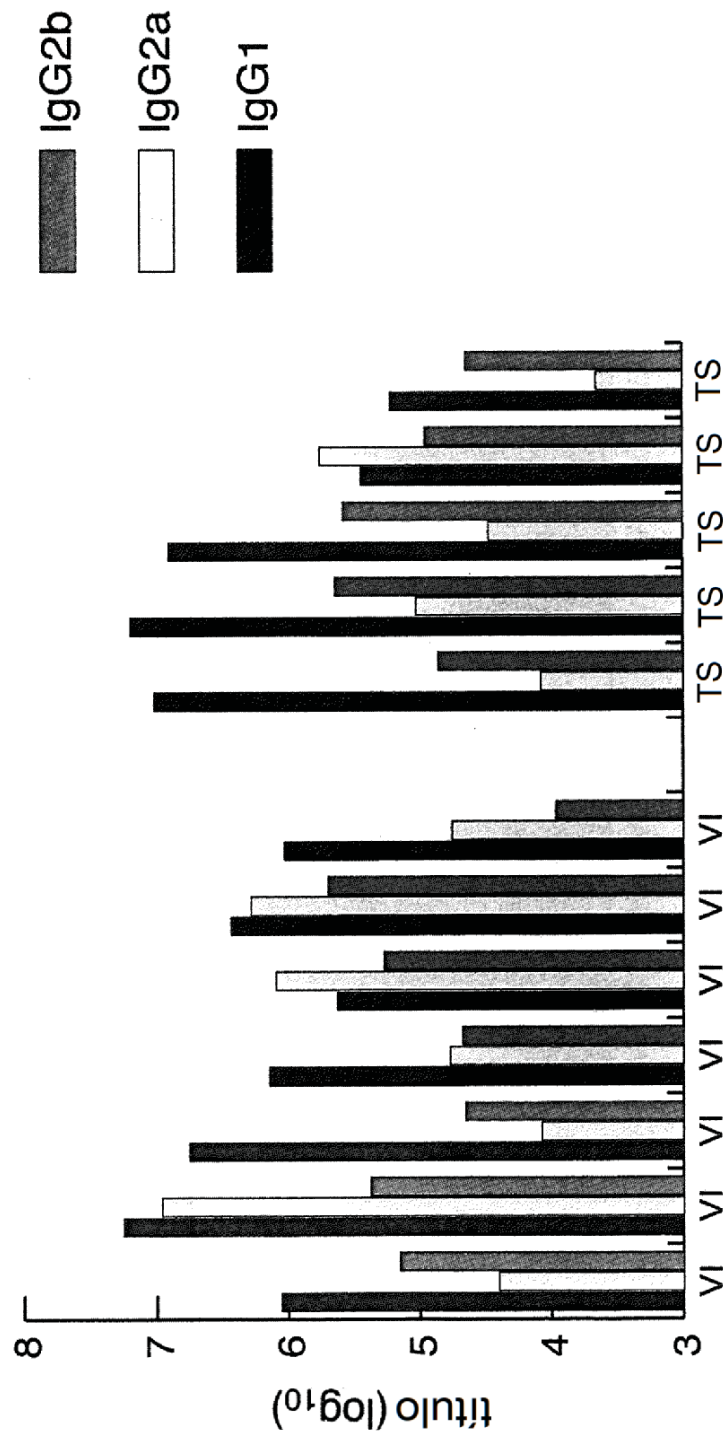


FIG. 10B

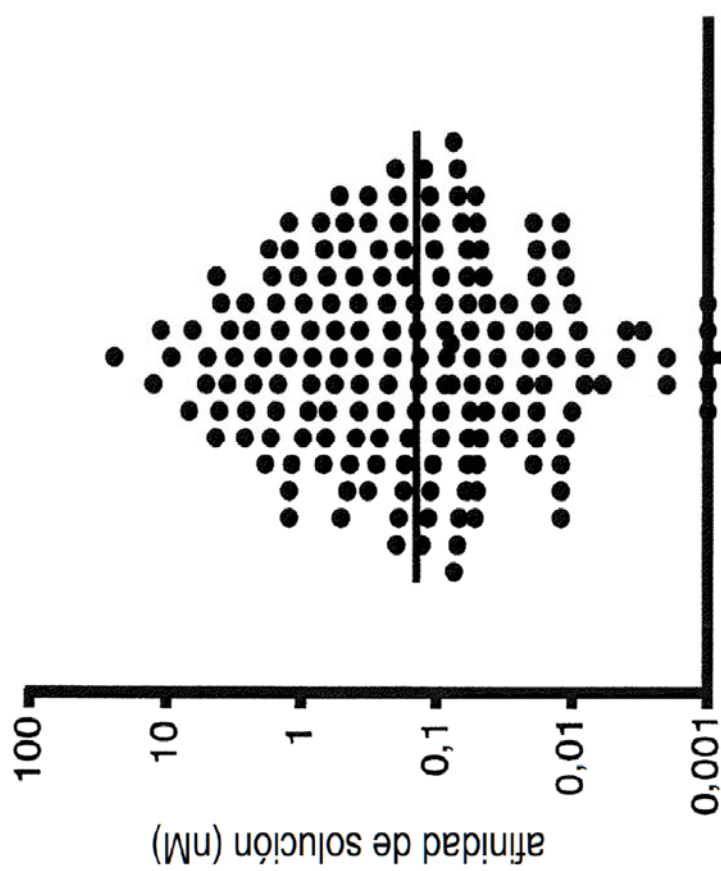


FIG. 11A

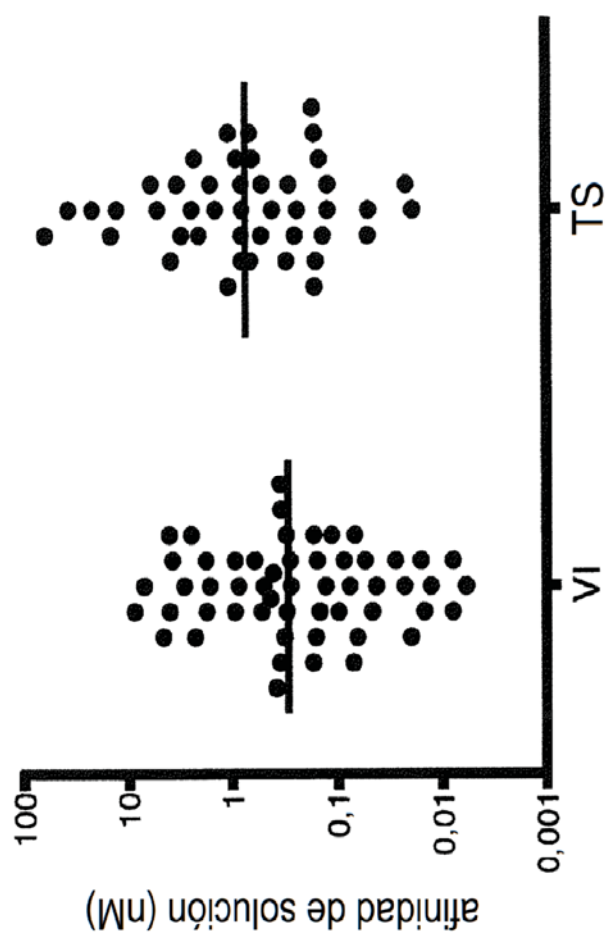


FIG. 11B

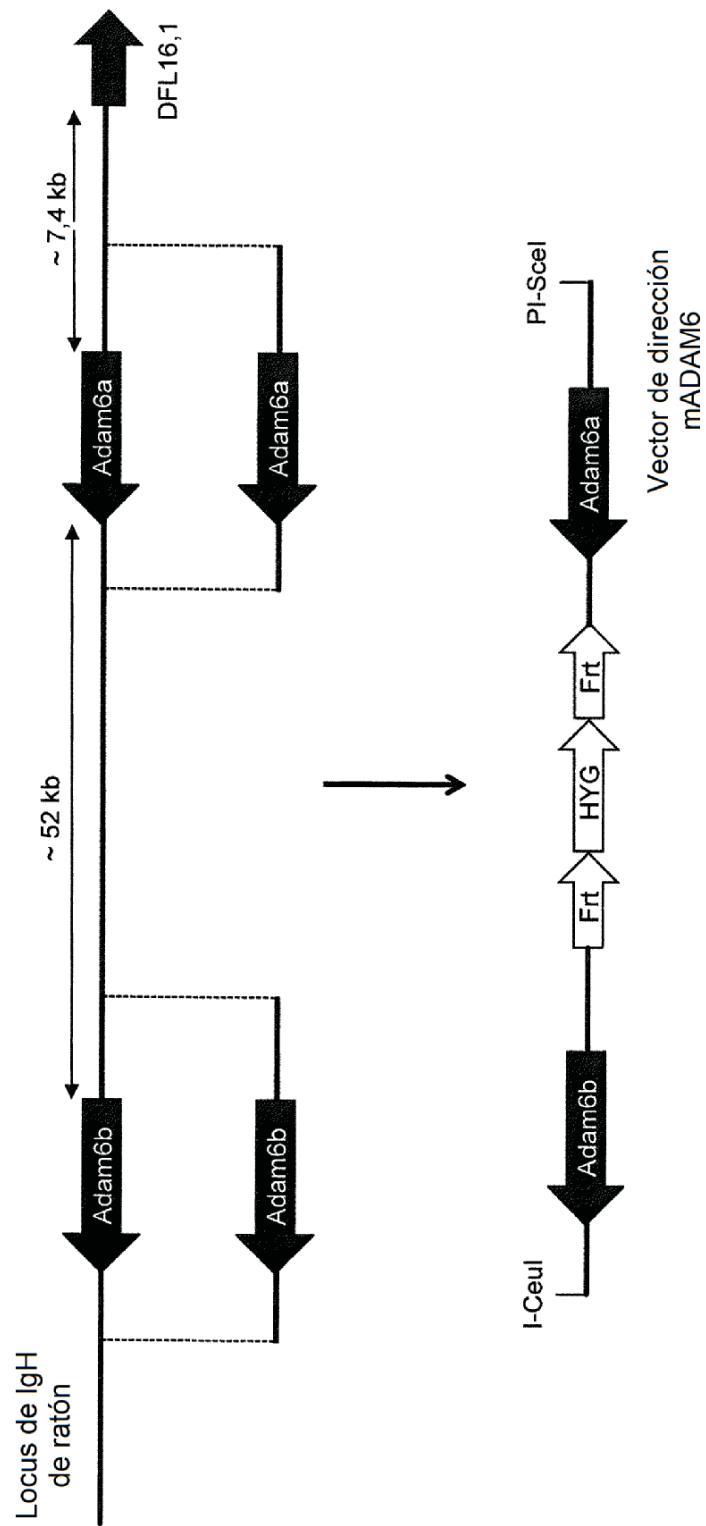


FIG. 12

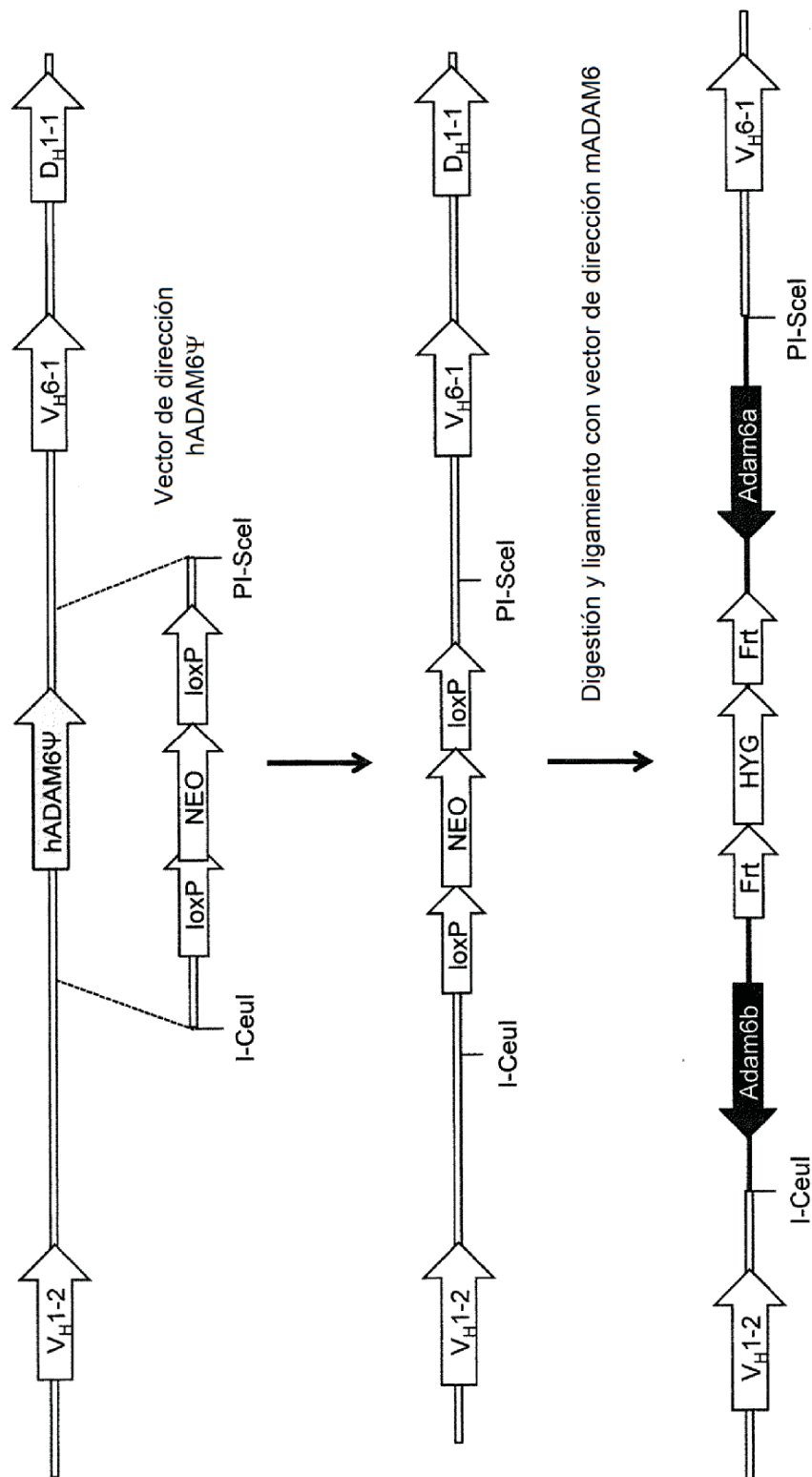


FIG. 13

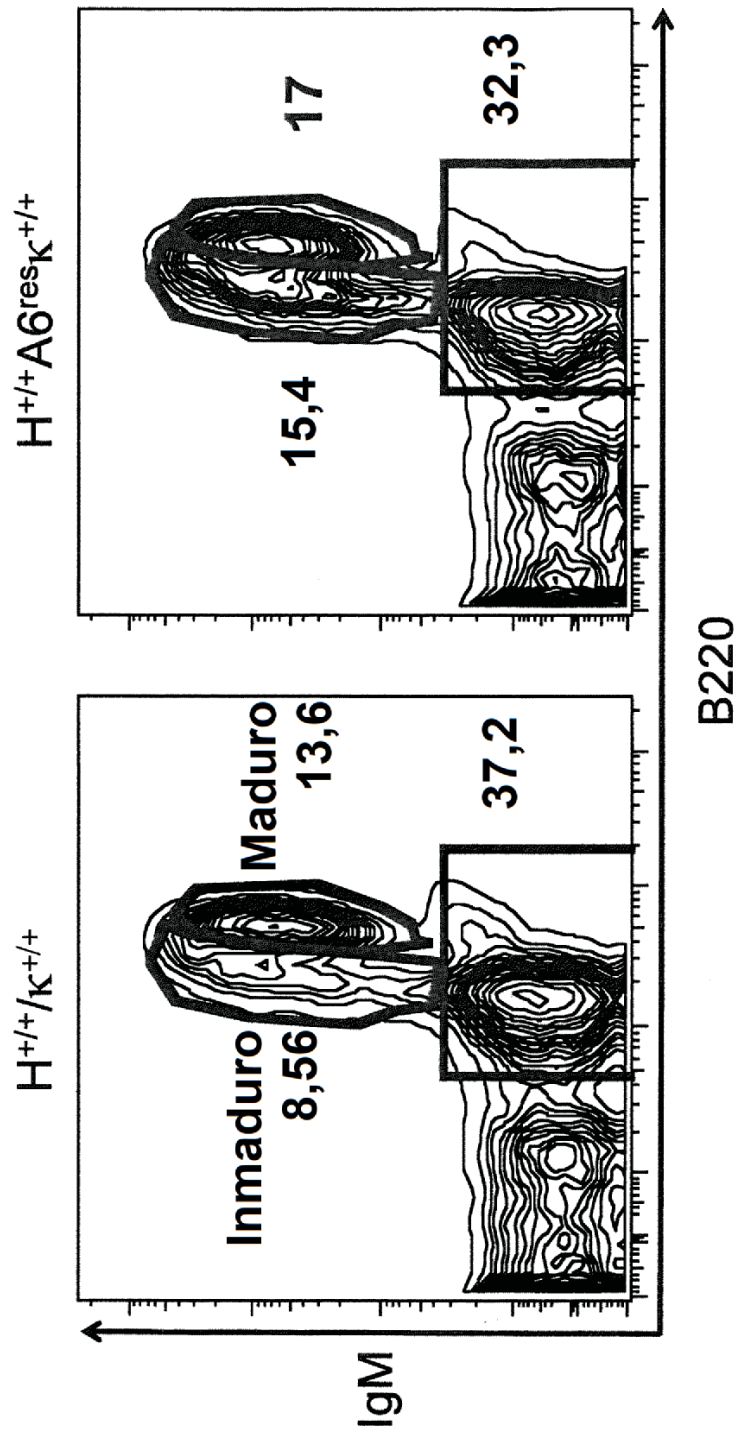
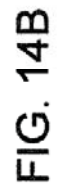


FIG. 14A



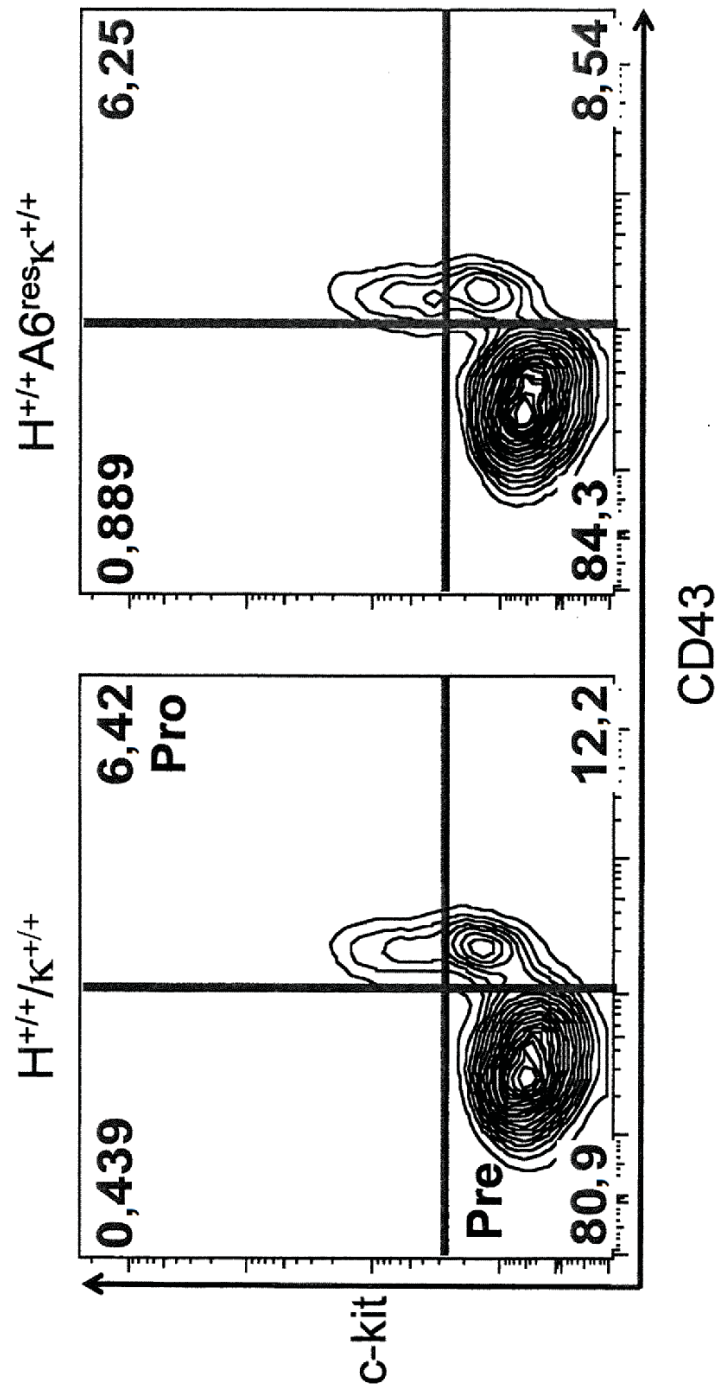


FIG. 15A

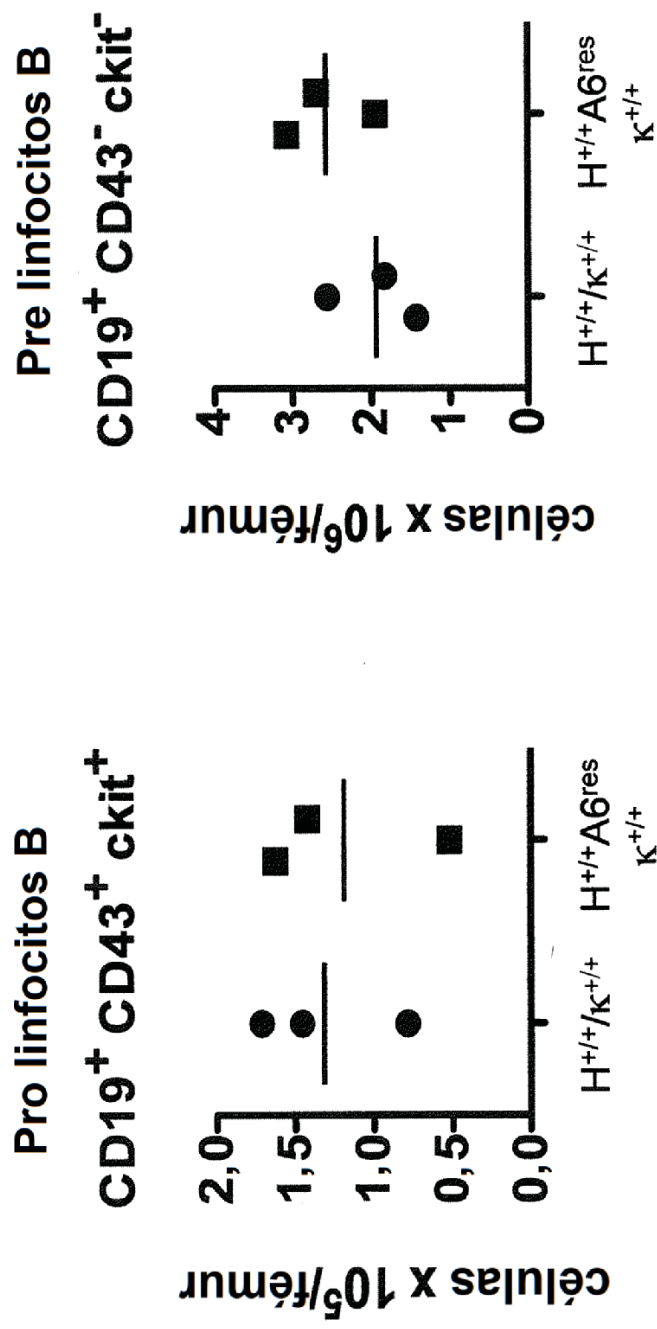


FIG. 15B

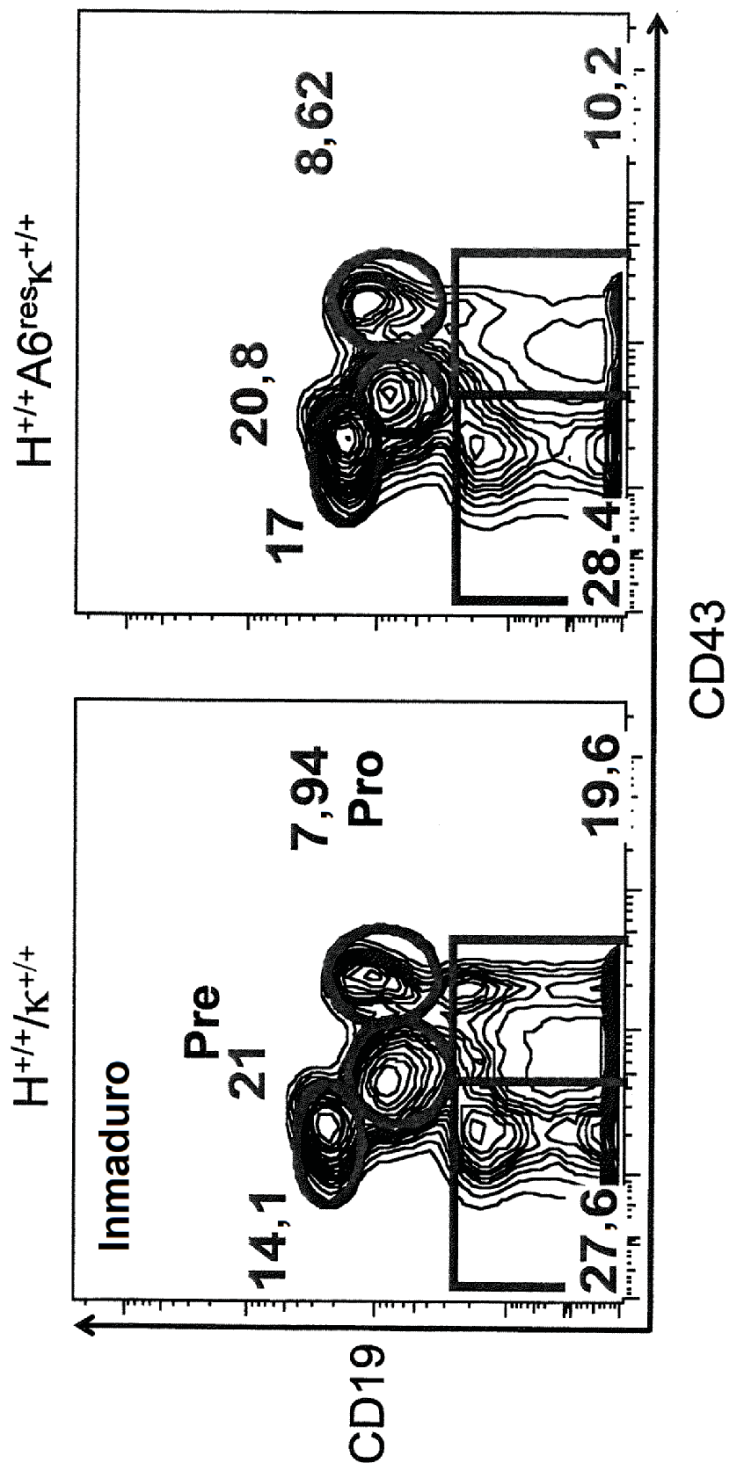


FIG. 16A

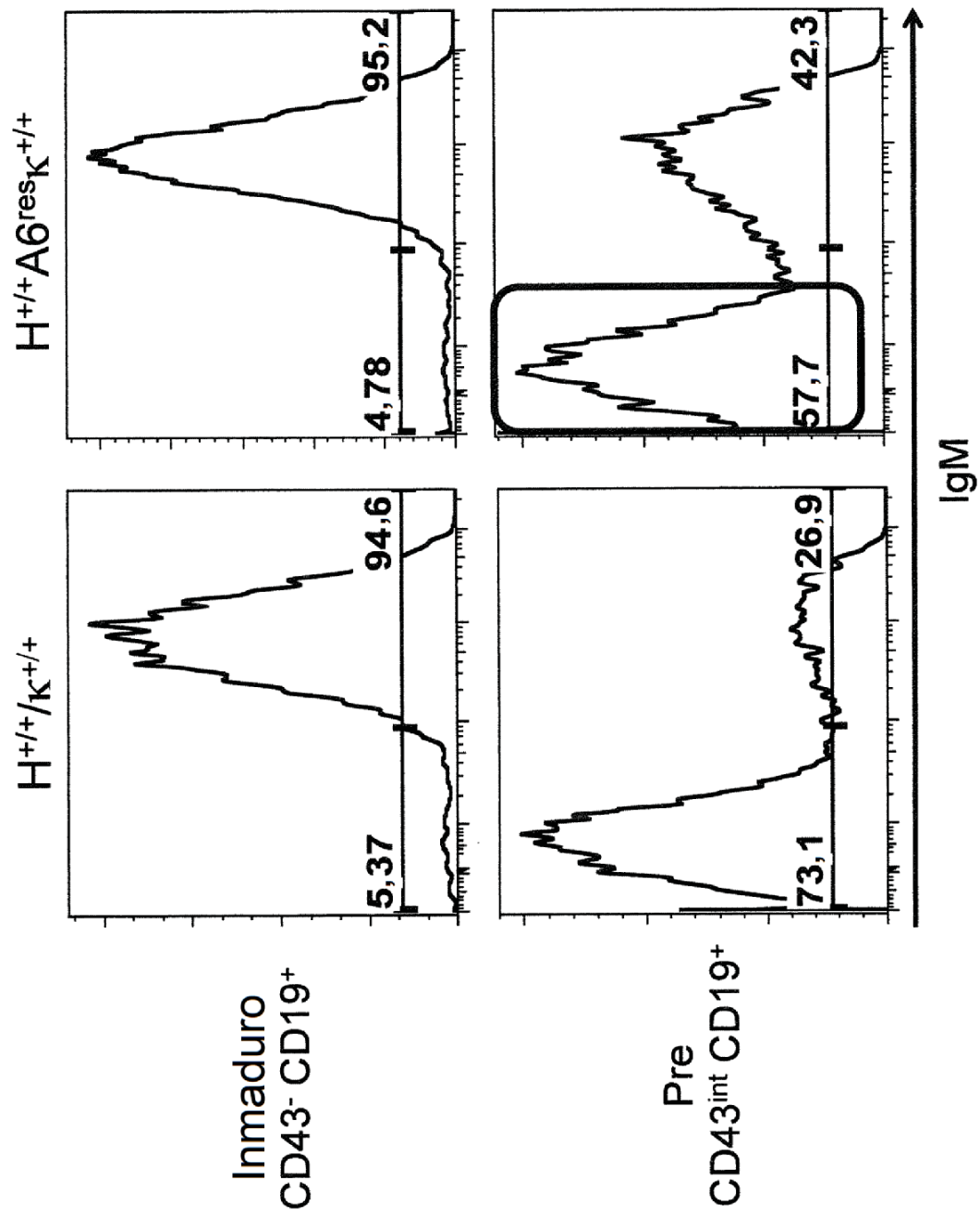


FIG. 16B

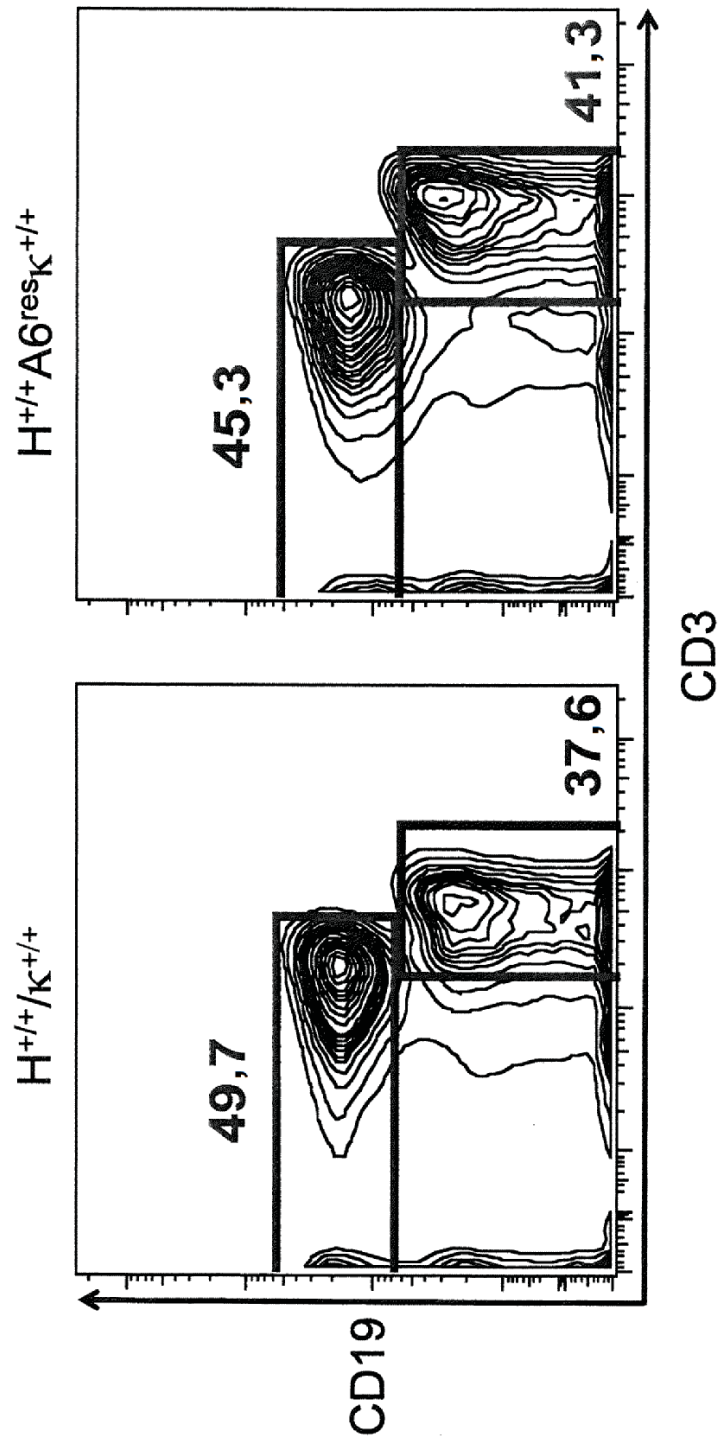


FIG. 17A

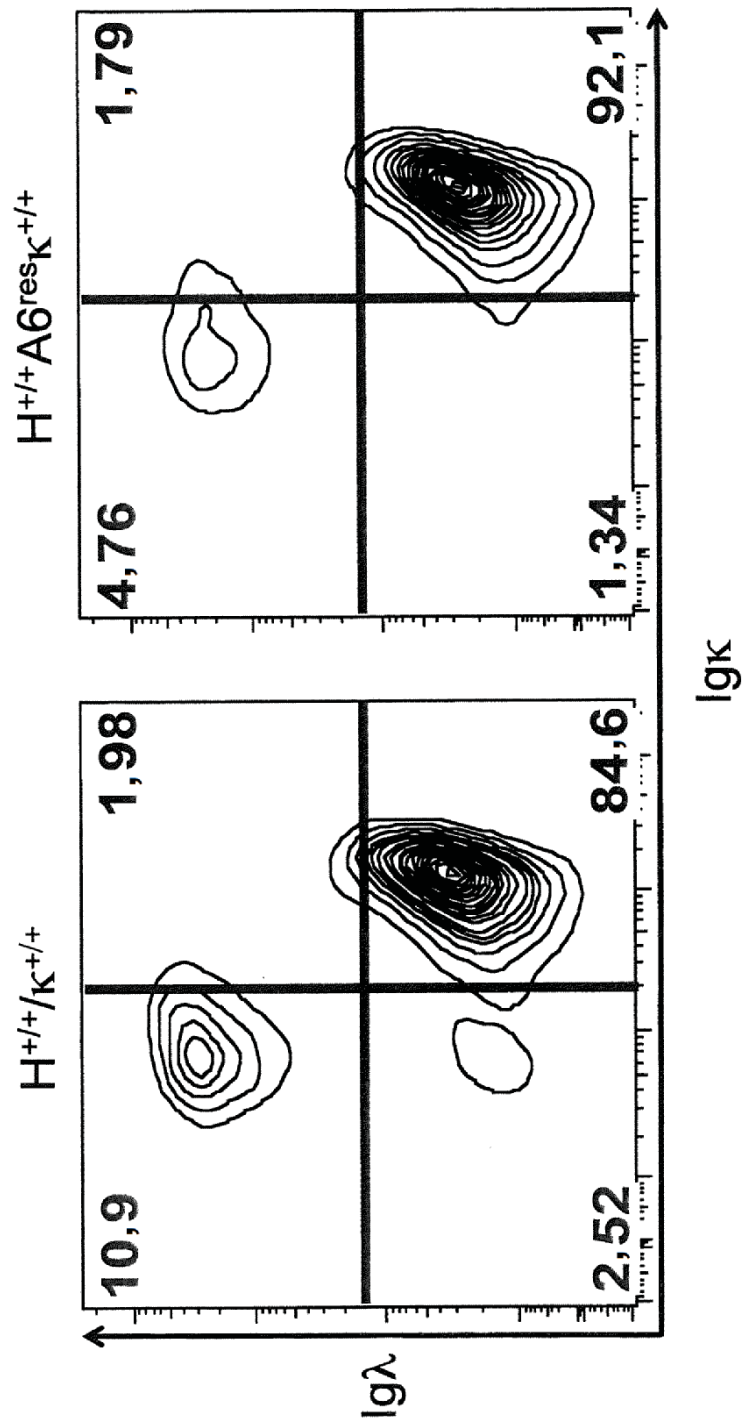


FIG. 17B

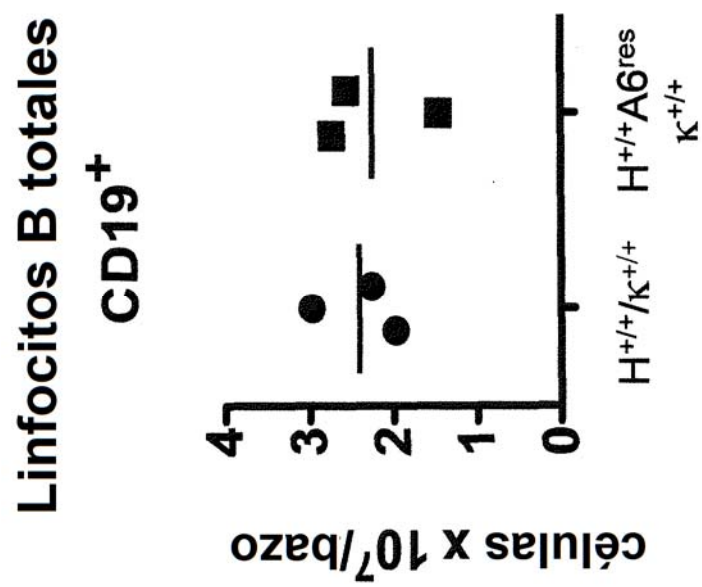


FIG. 17C

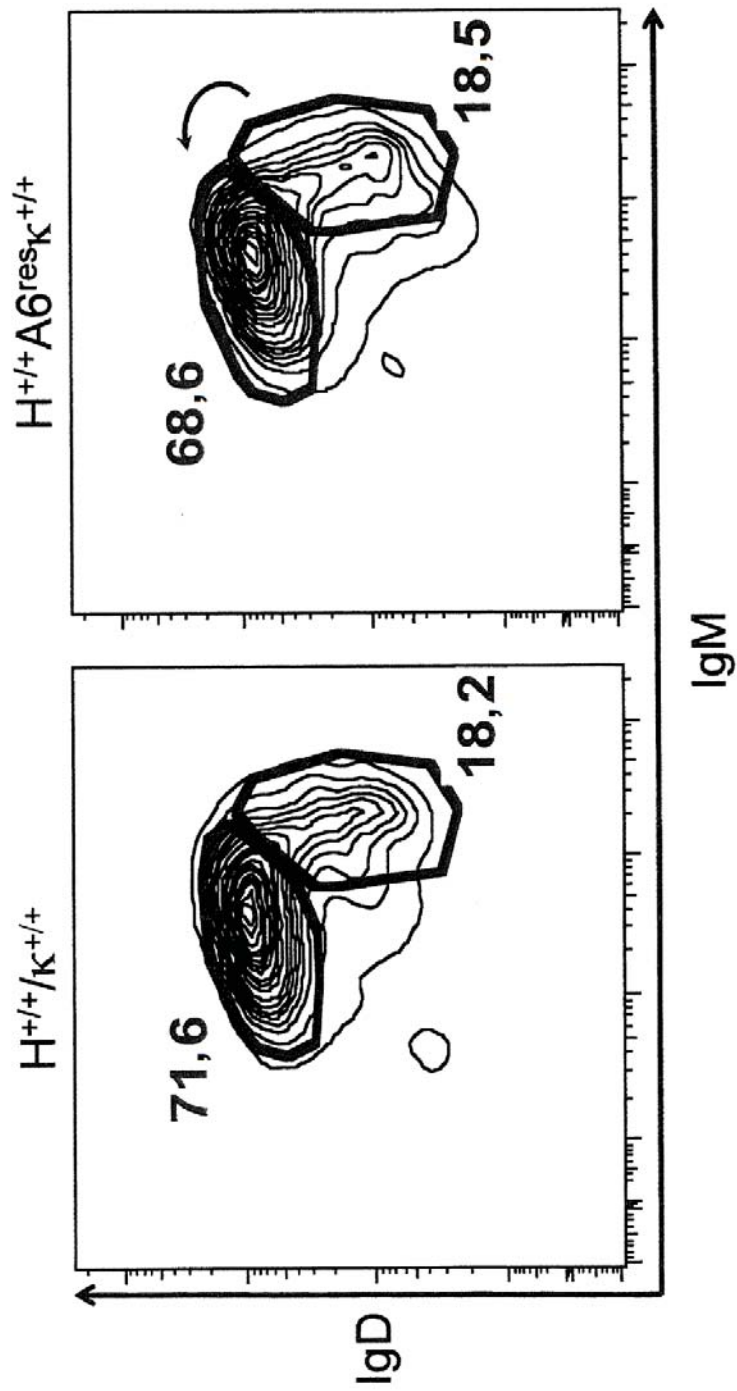


FIG. 18A

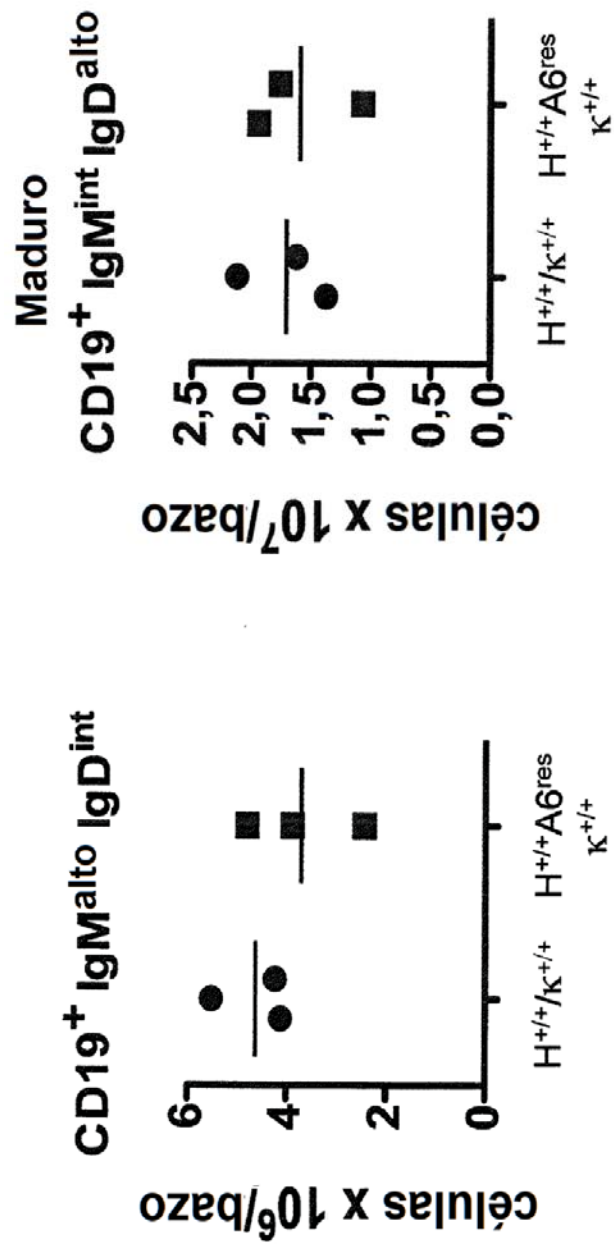


FIG. 18B

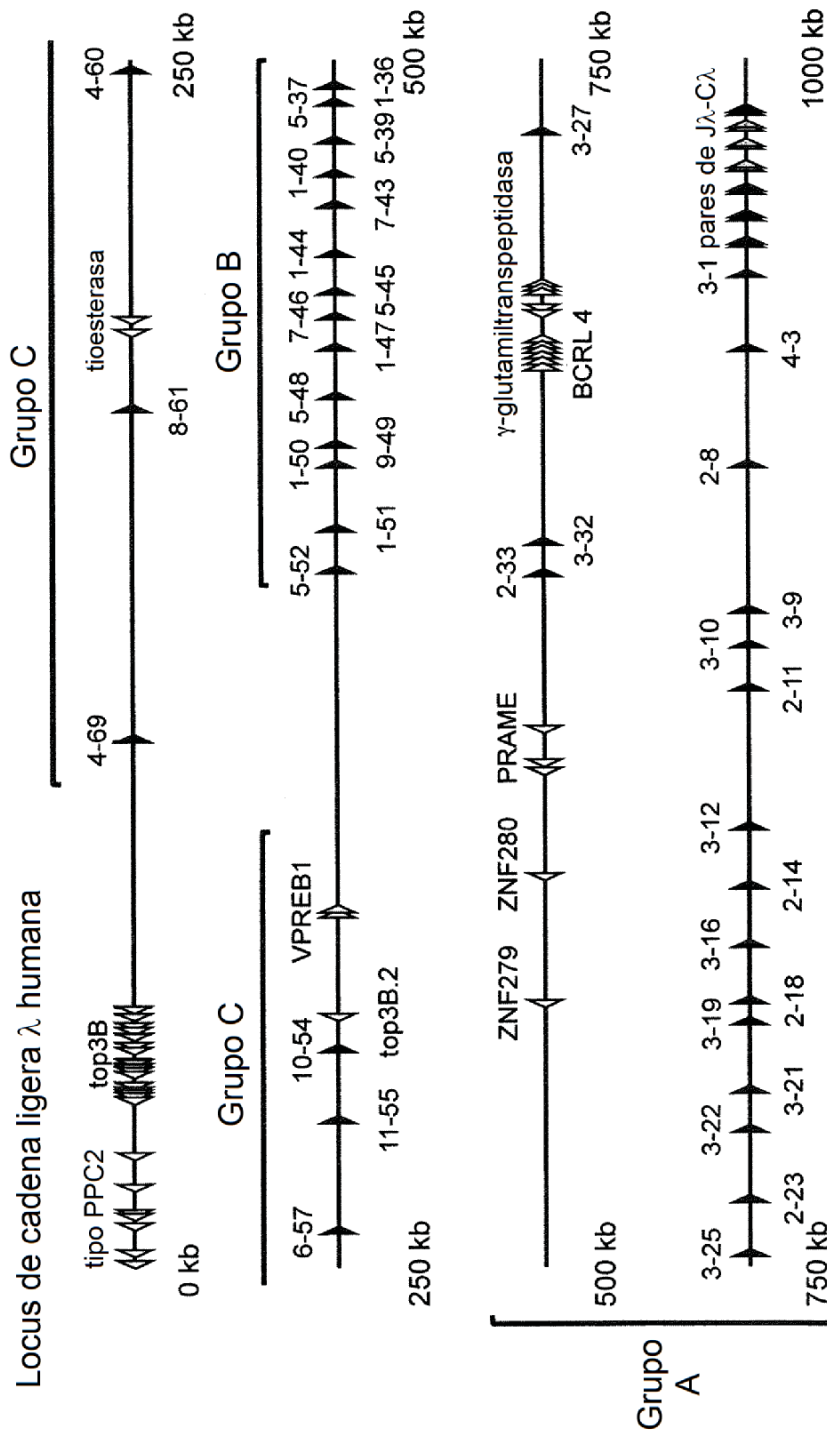


FIG. 19

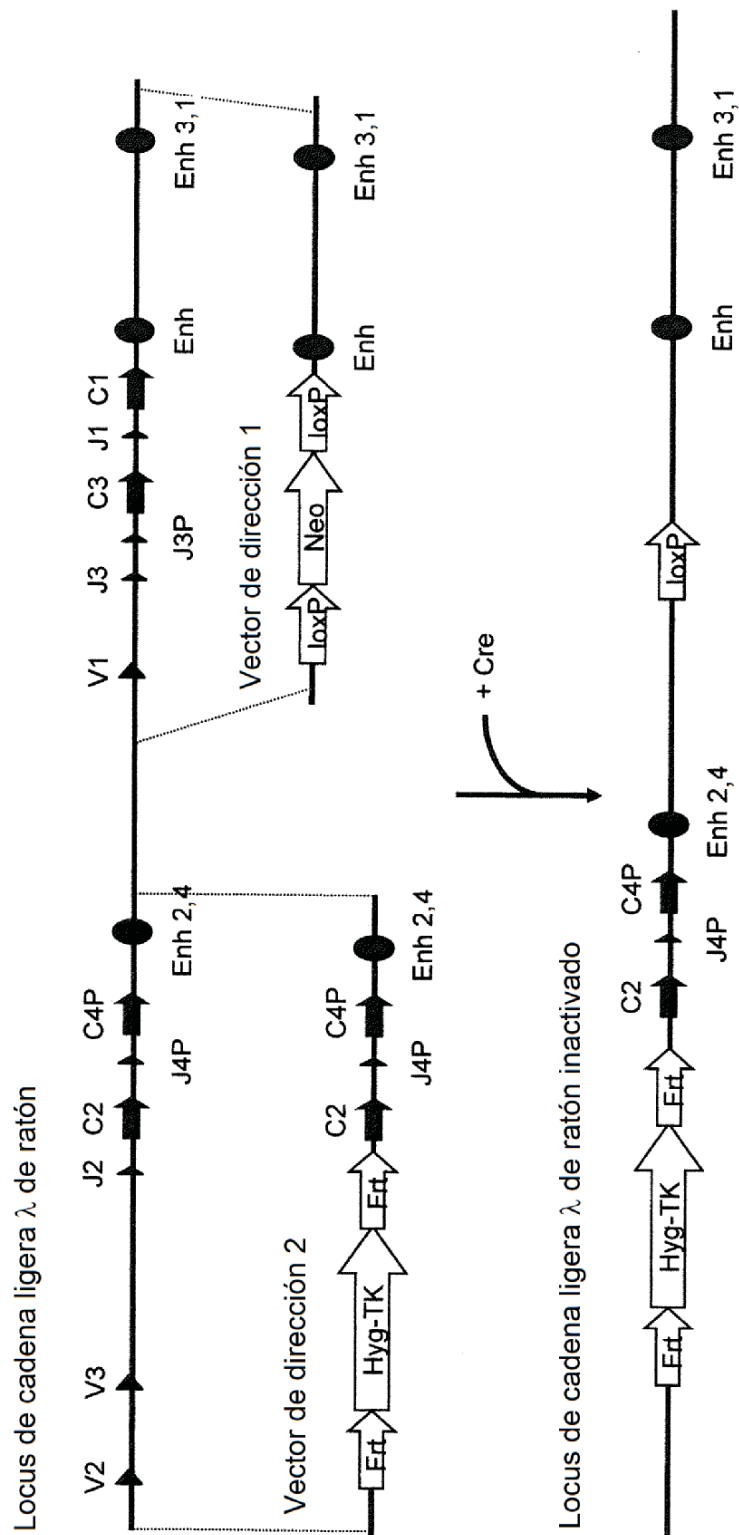


FIG. 20

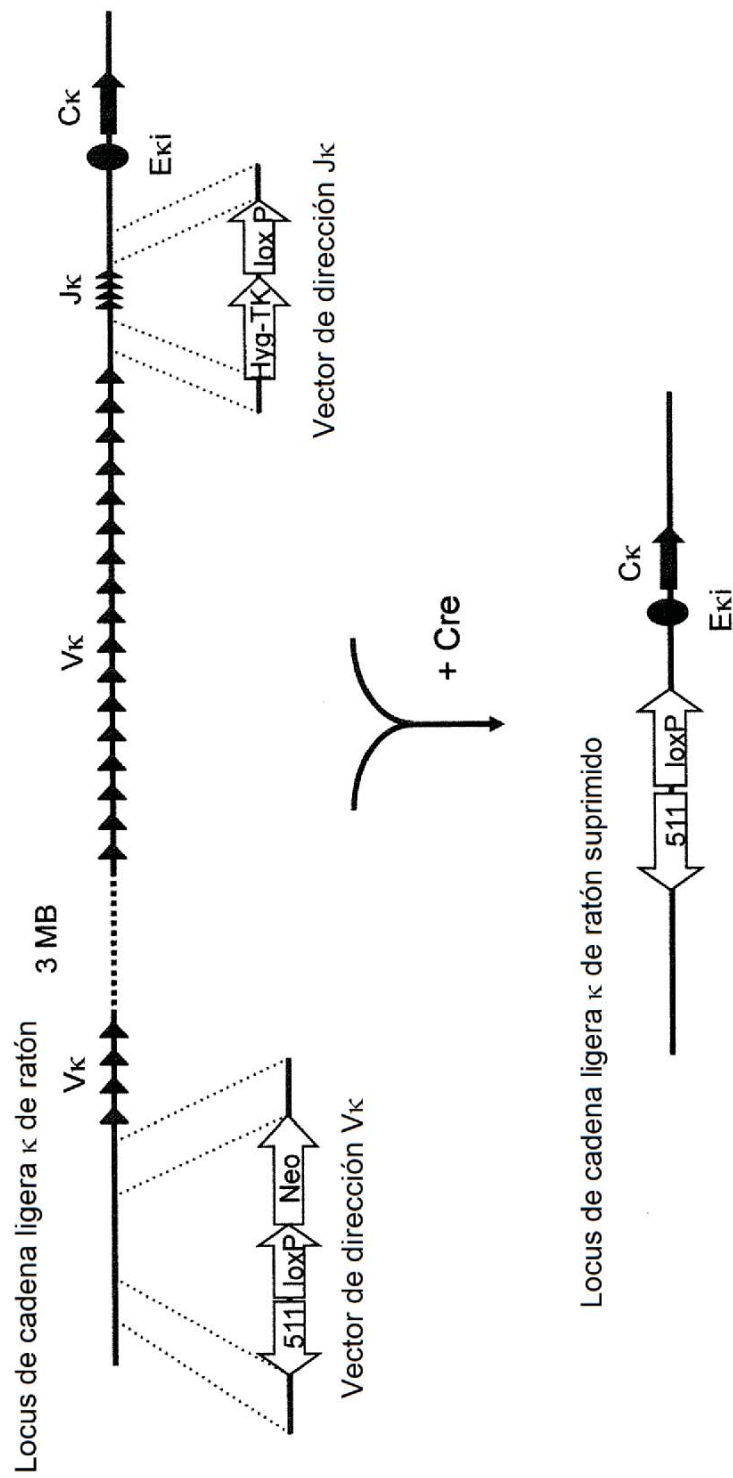


FIG. 21

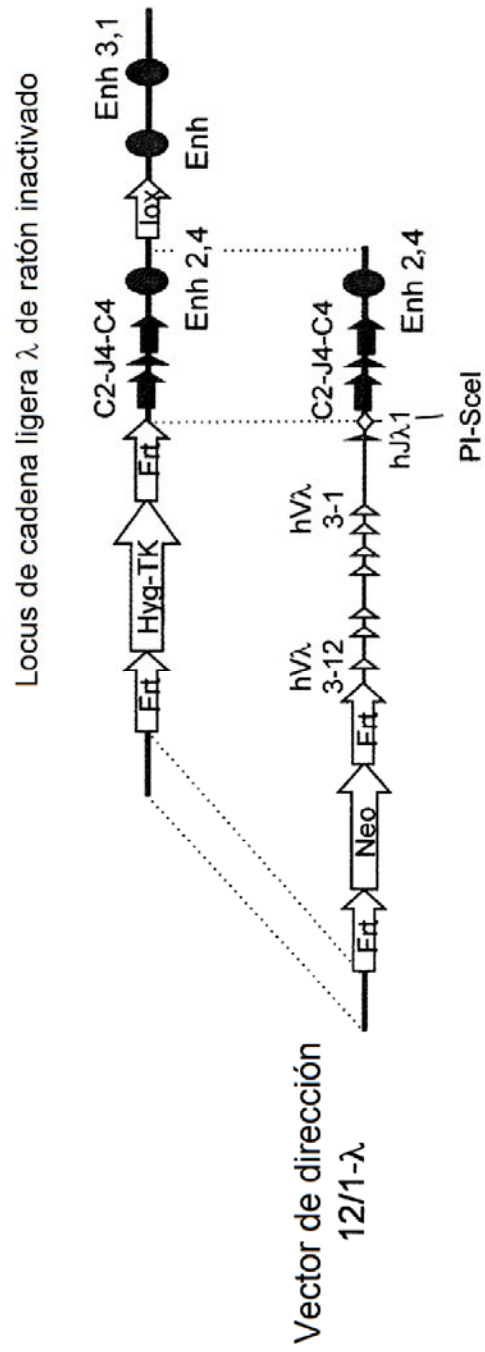


FIG. 22A

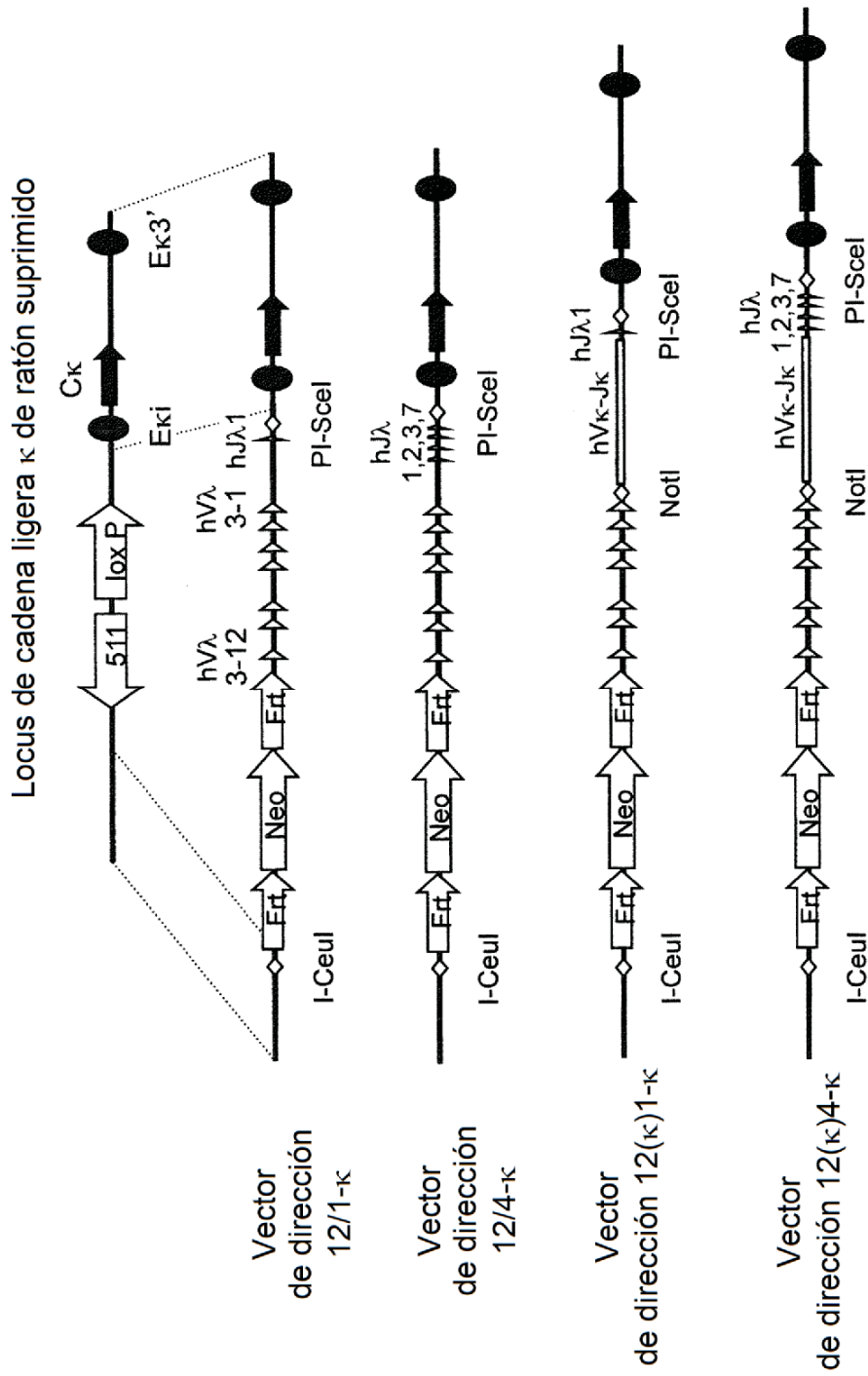


FIG. 22B

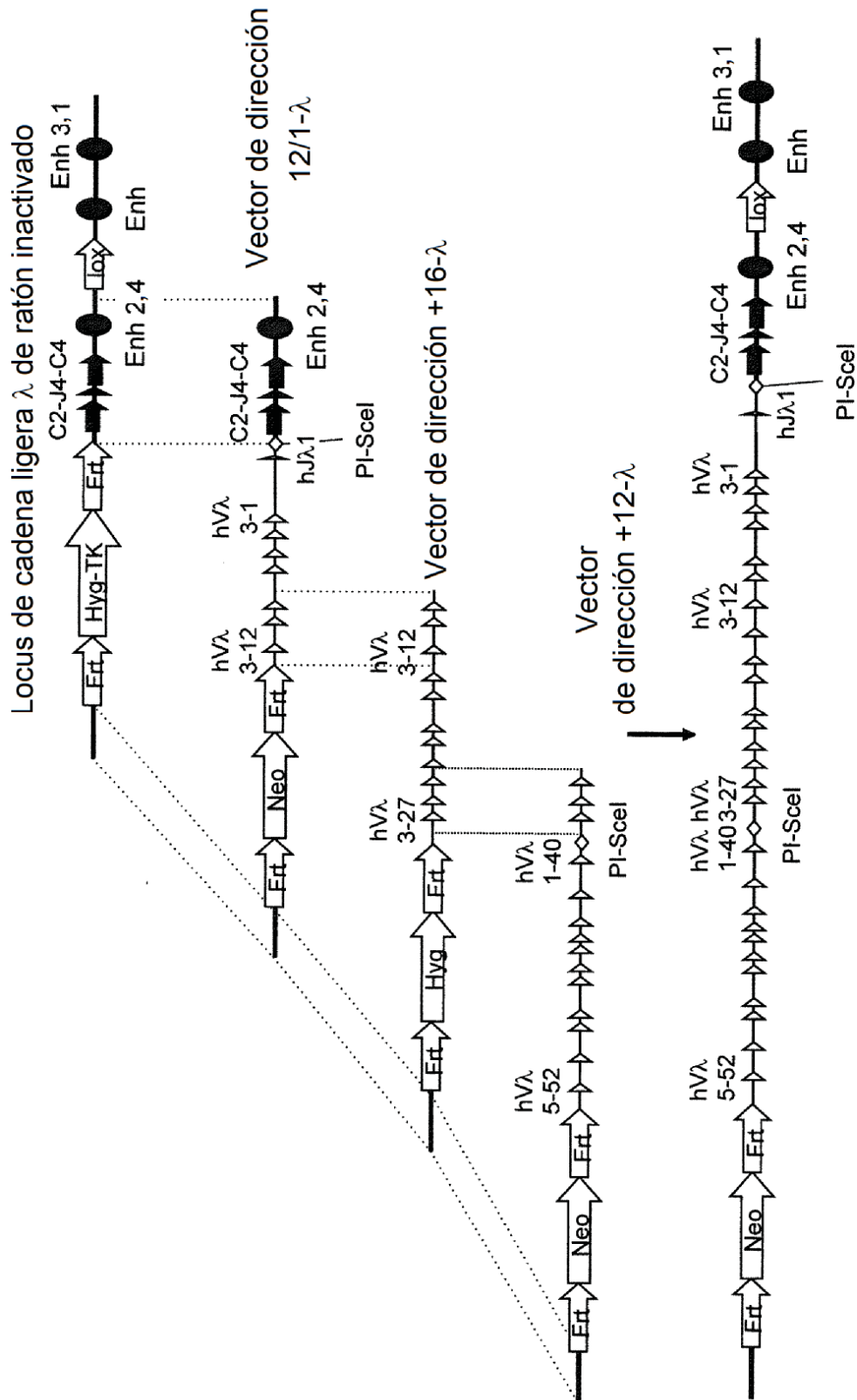


FIG. 23A

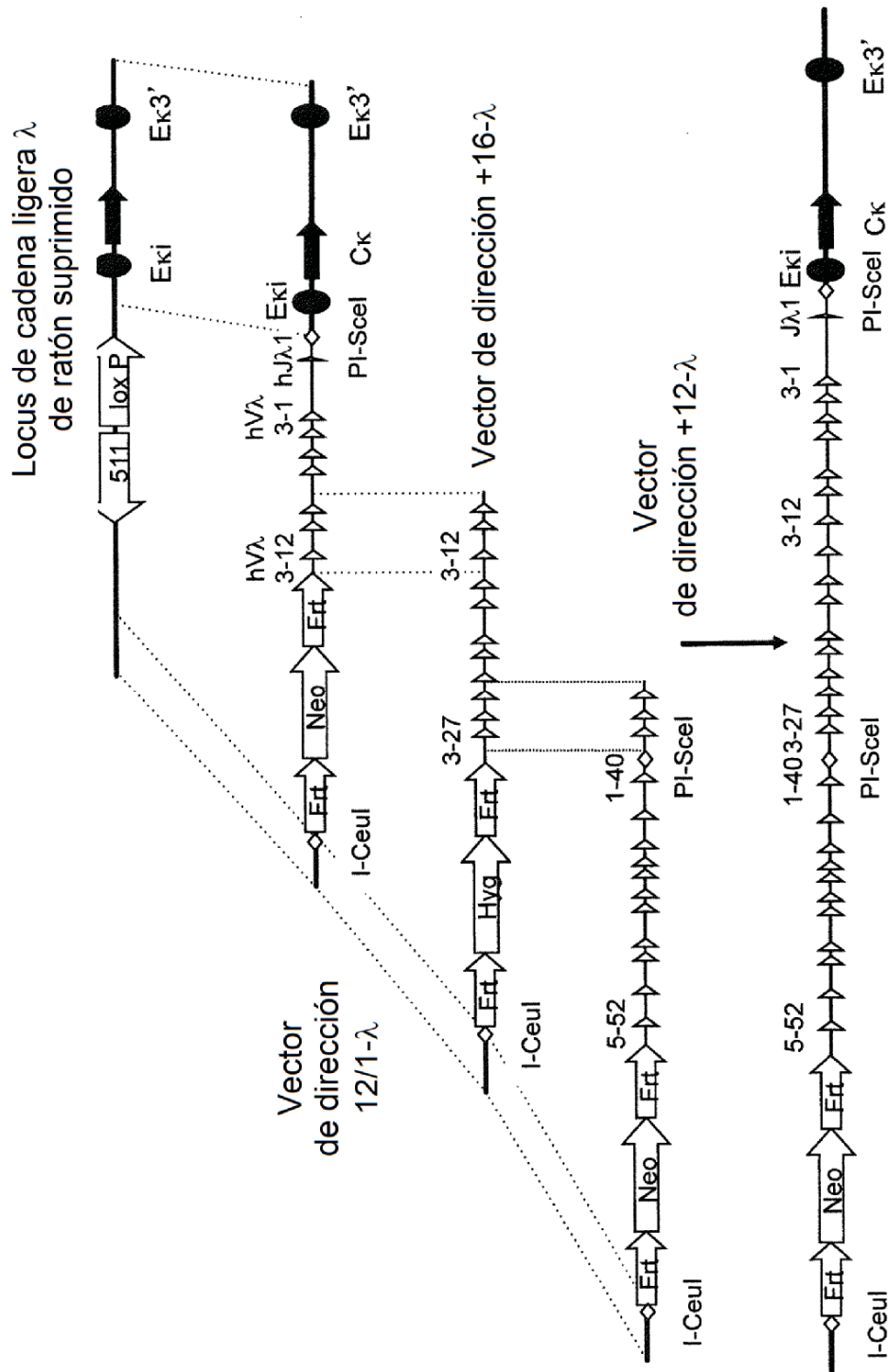


FIG. 23B

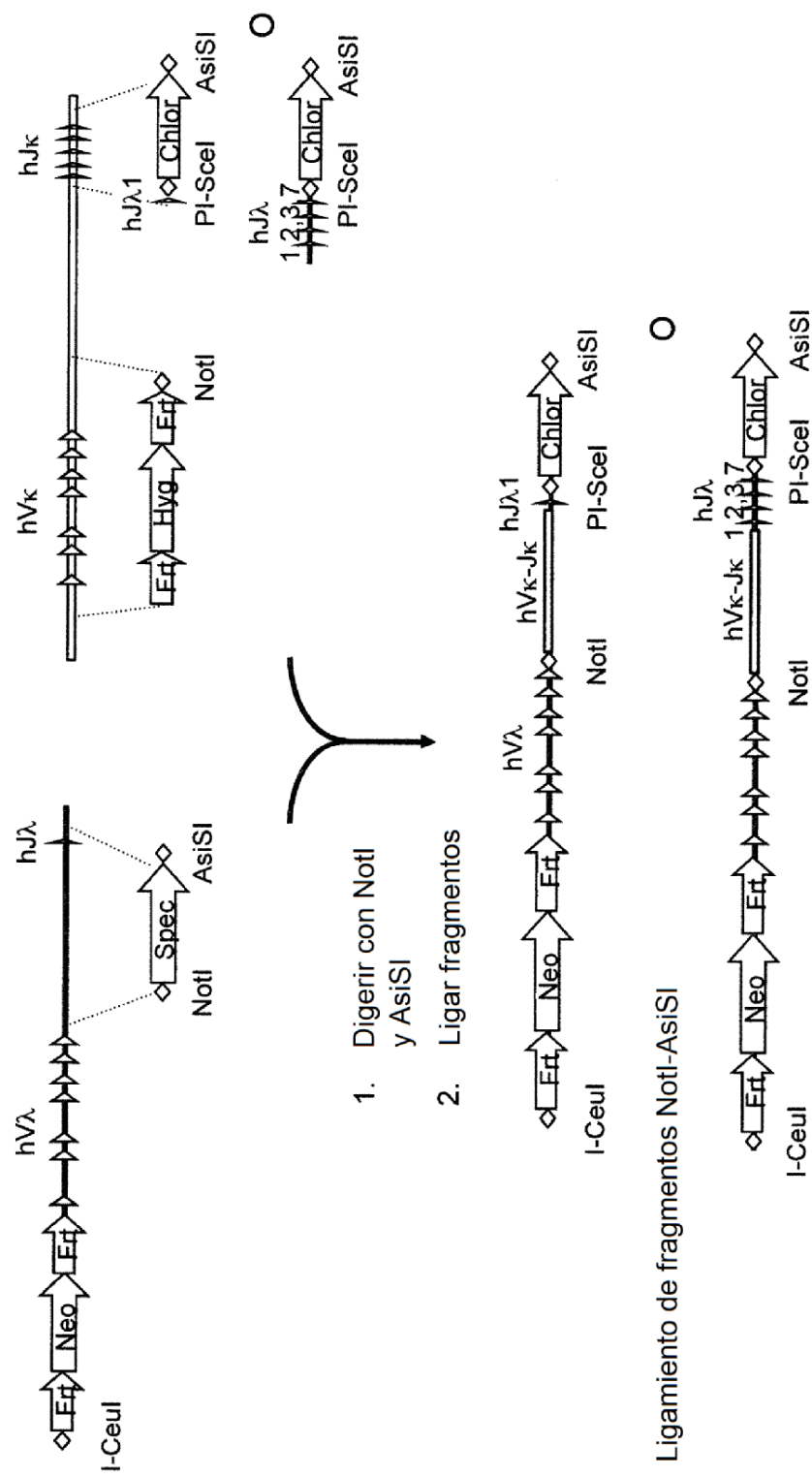


FIG. 24

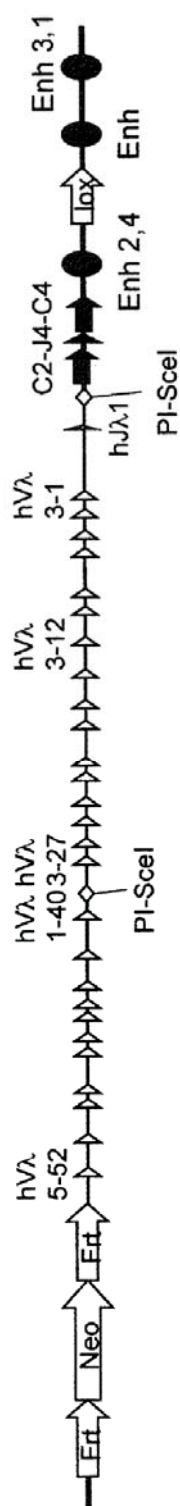


FIG. 25A

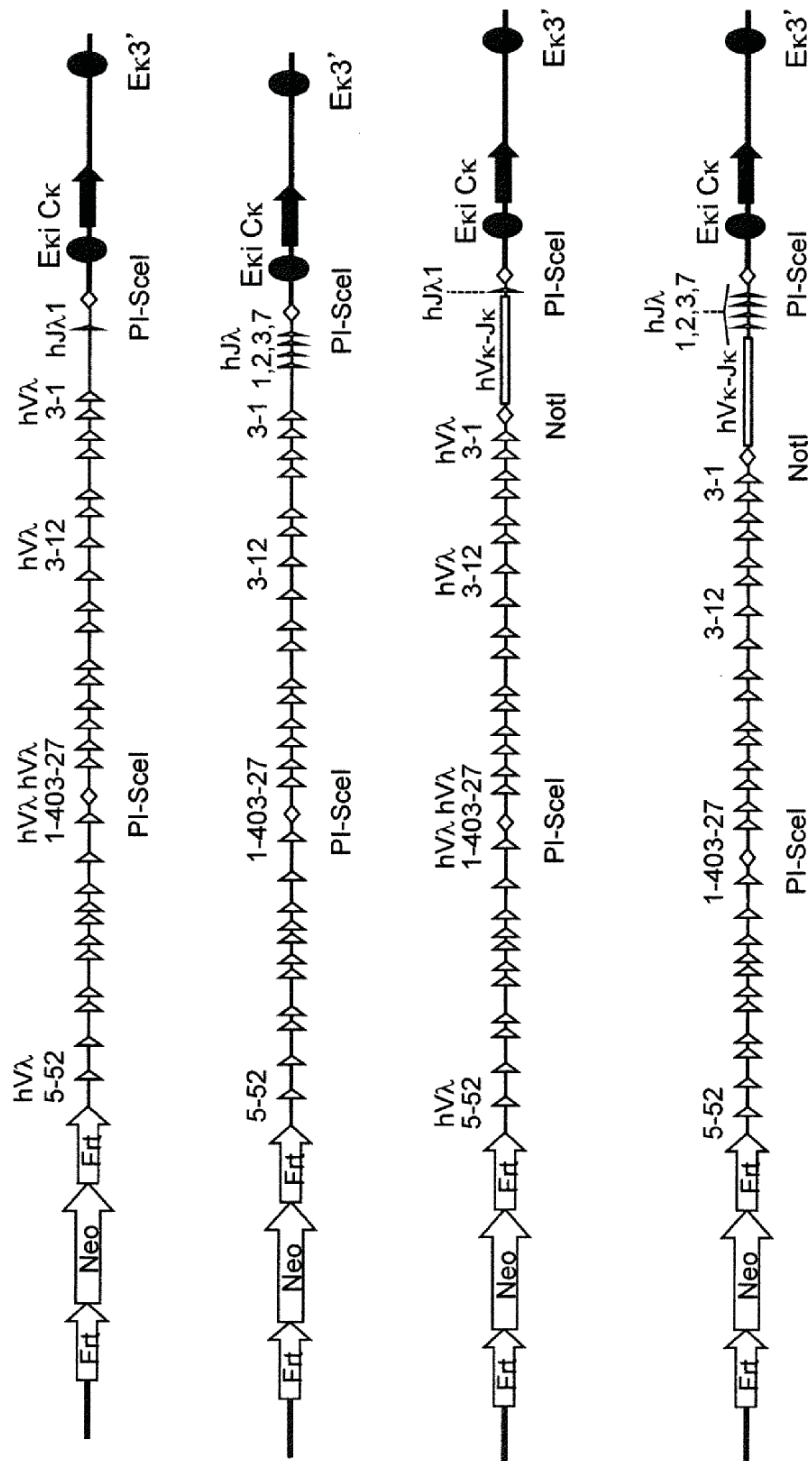


FIG. 25B

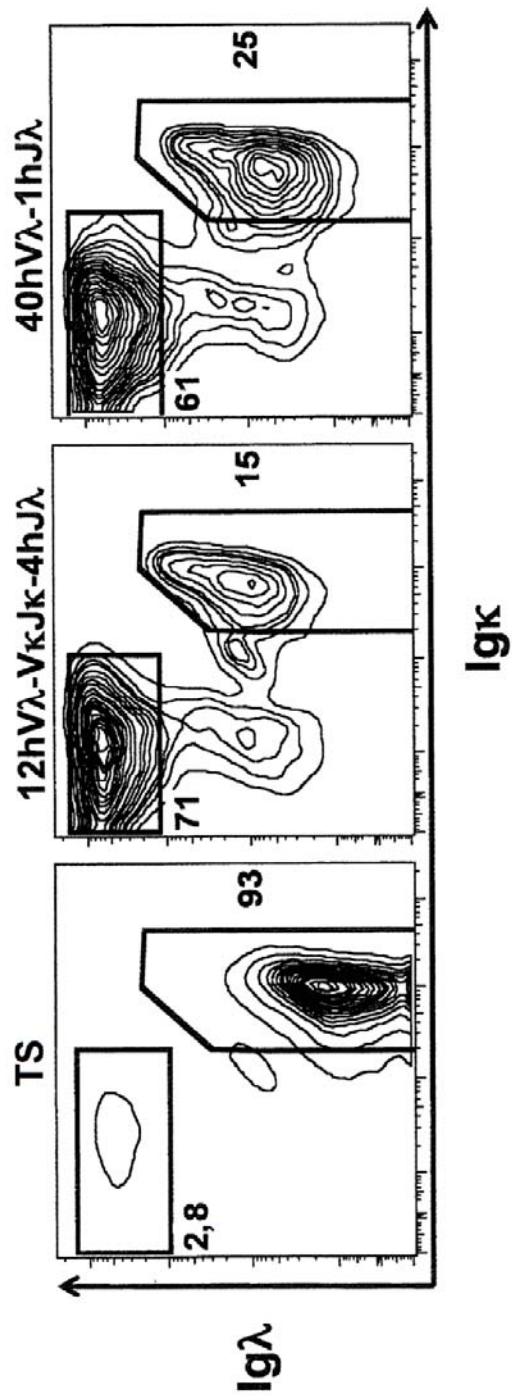


FIG. 26A

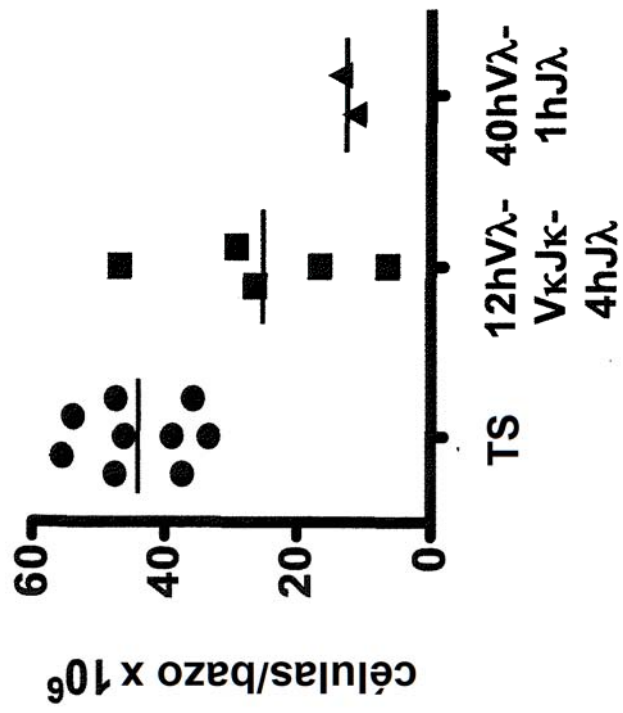


FIG. 26B

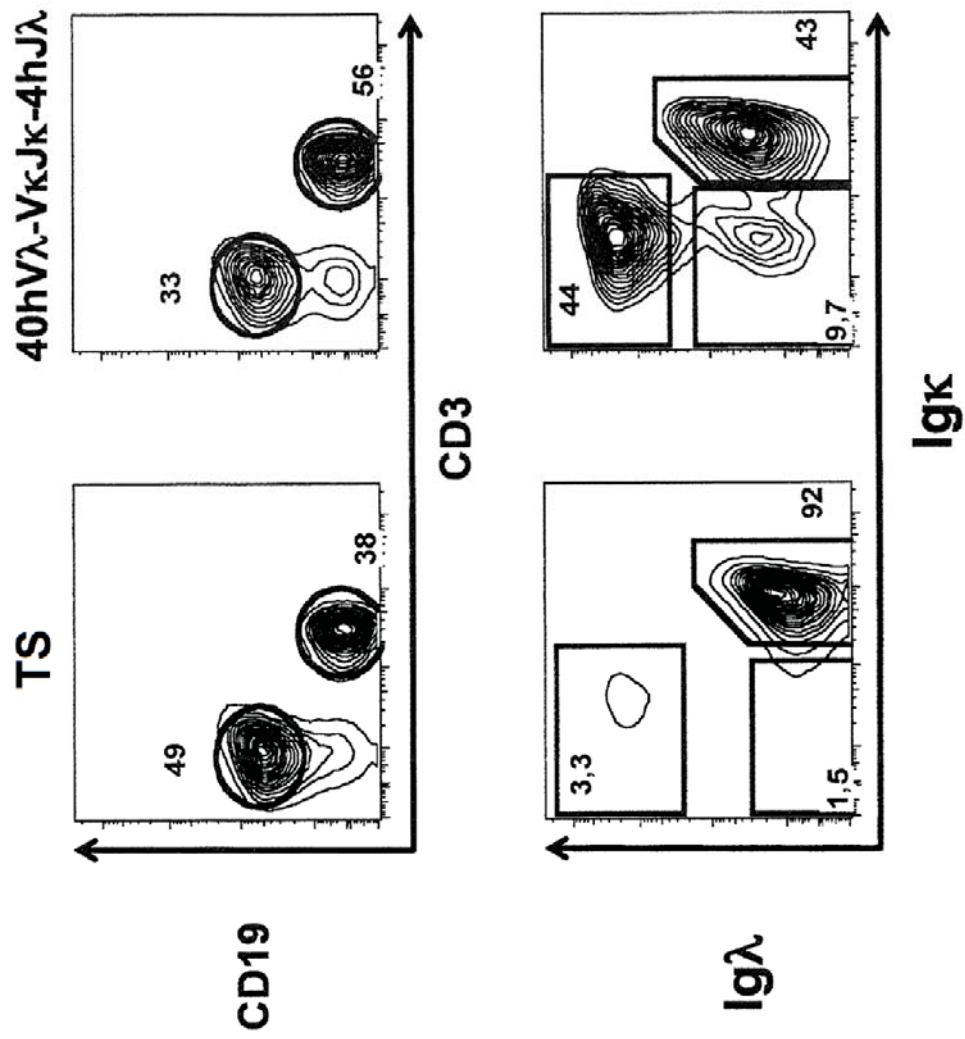


FIG. 27A

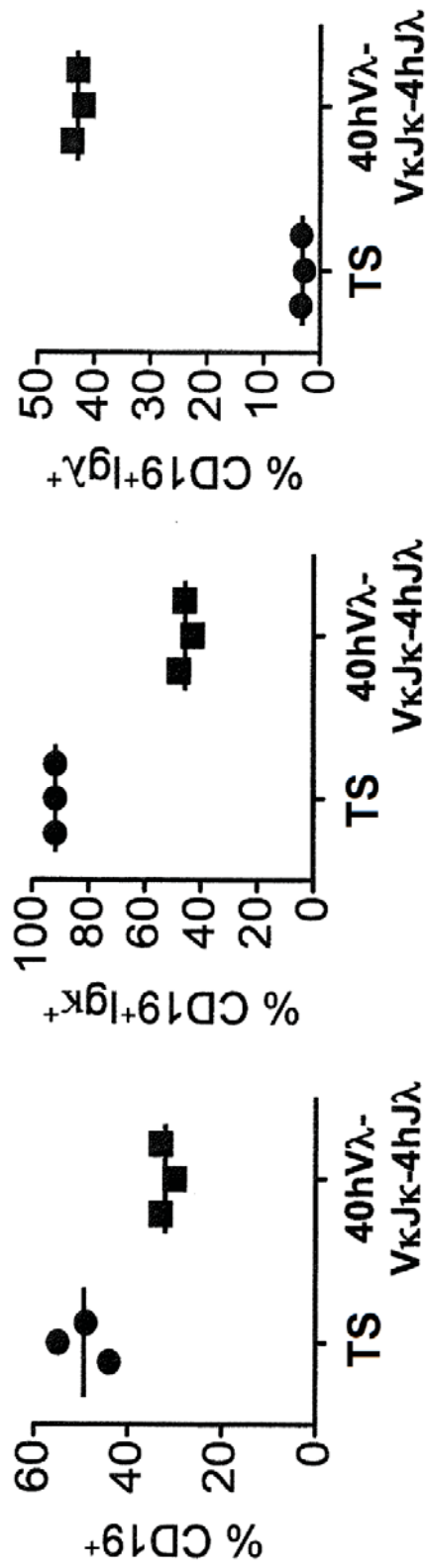


FIG. 27B

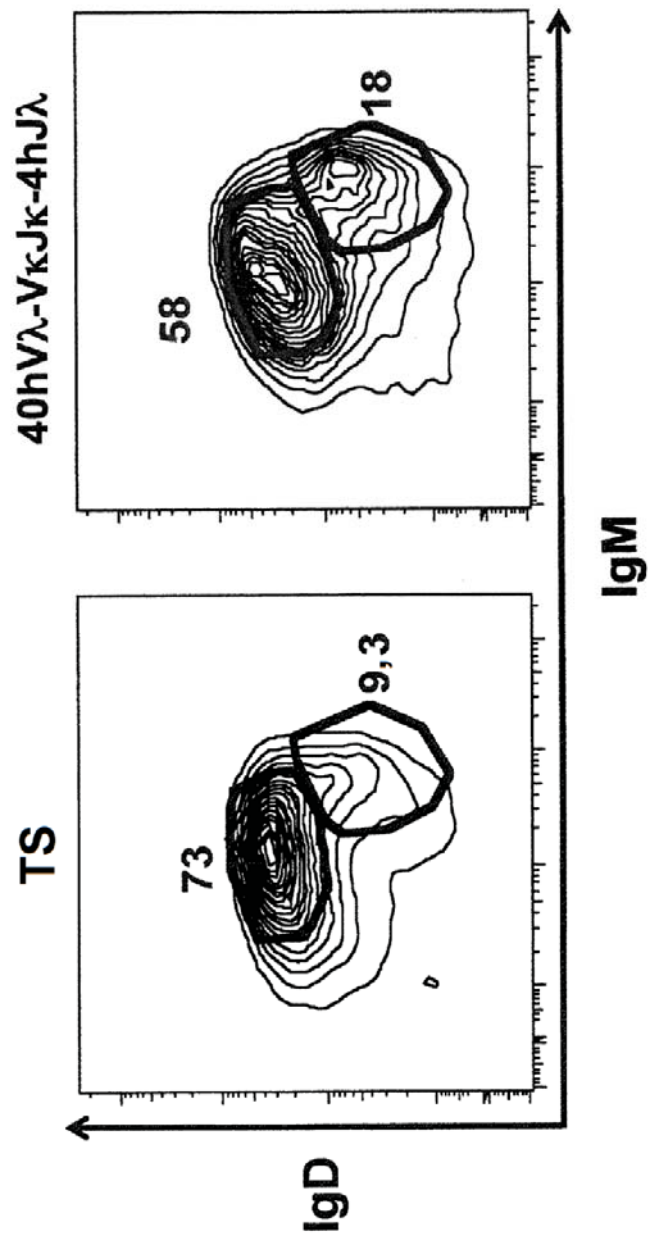


FIG. 27C

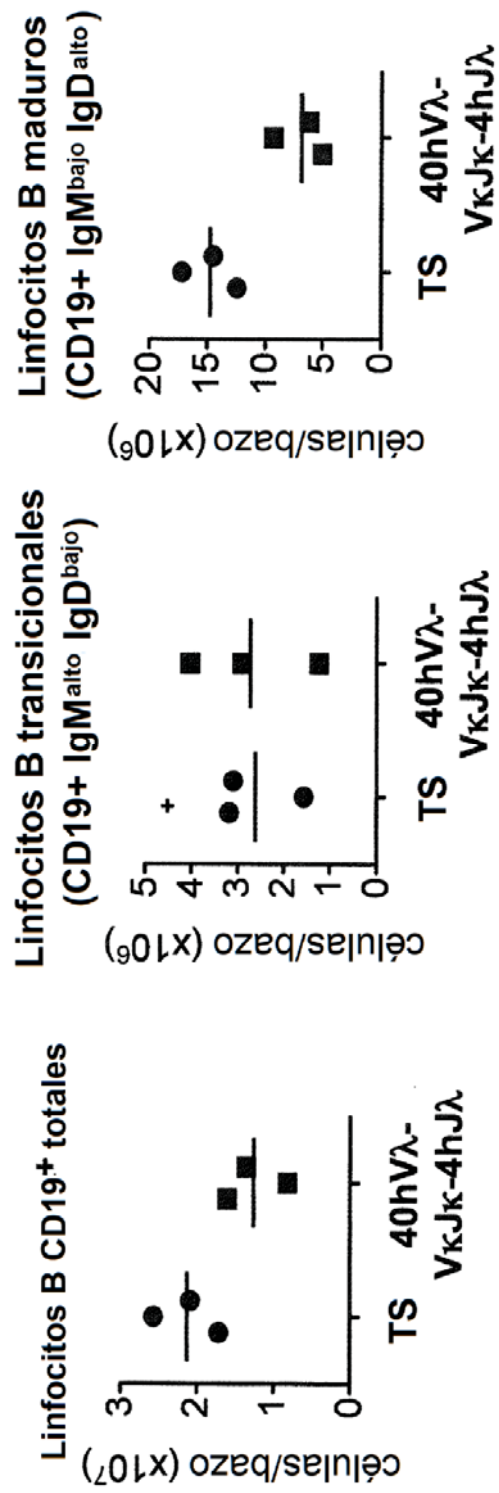


FIG. 27D

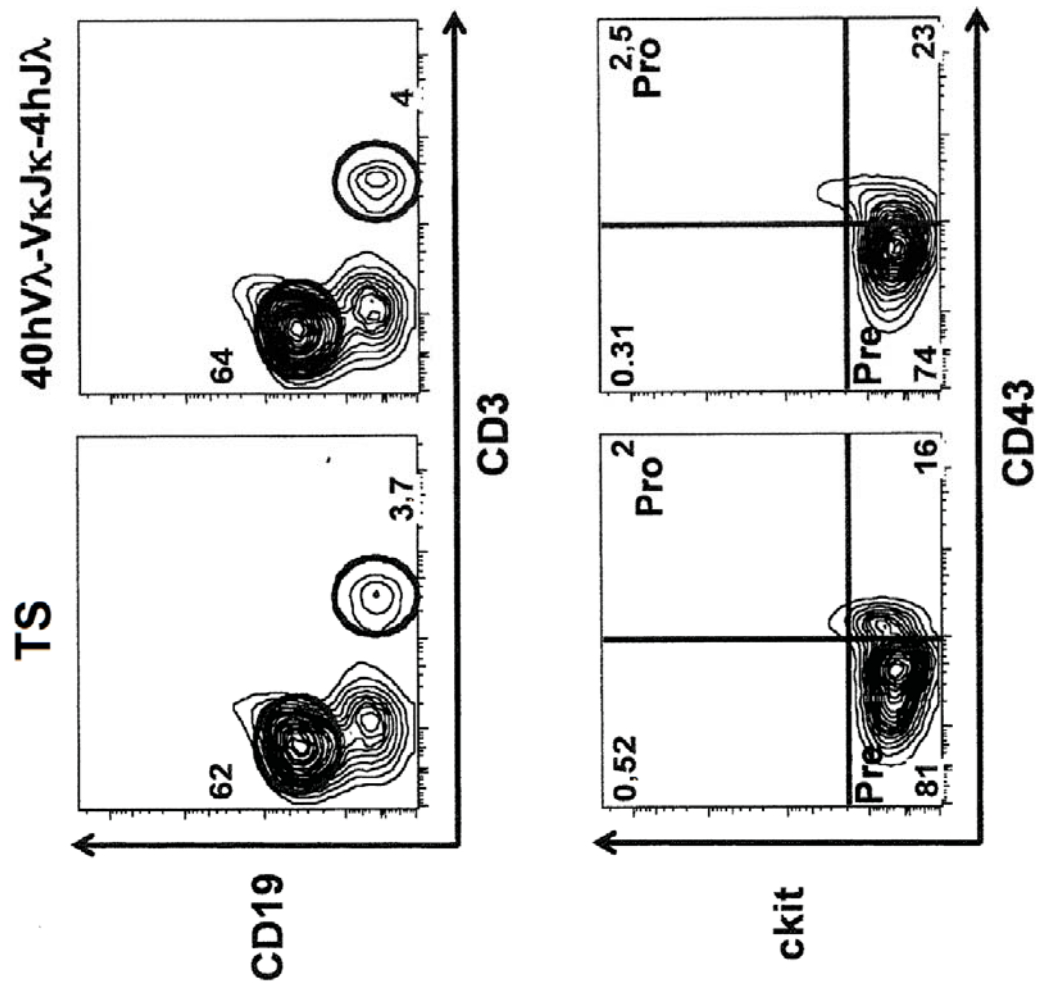


FIG. 28A

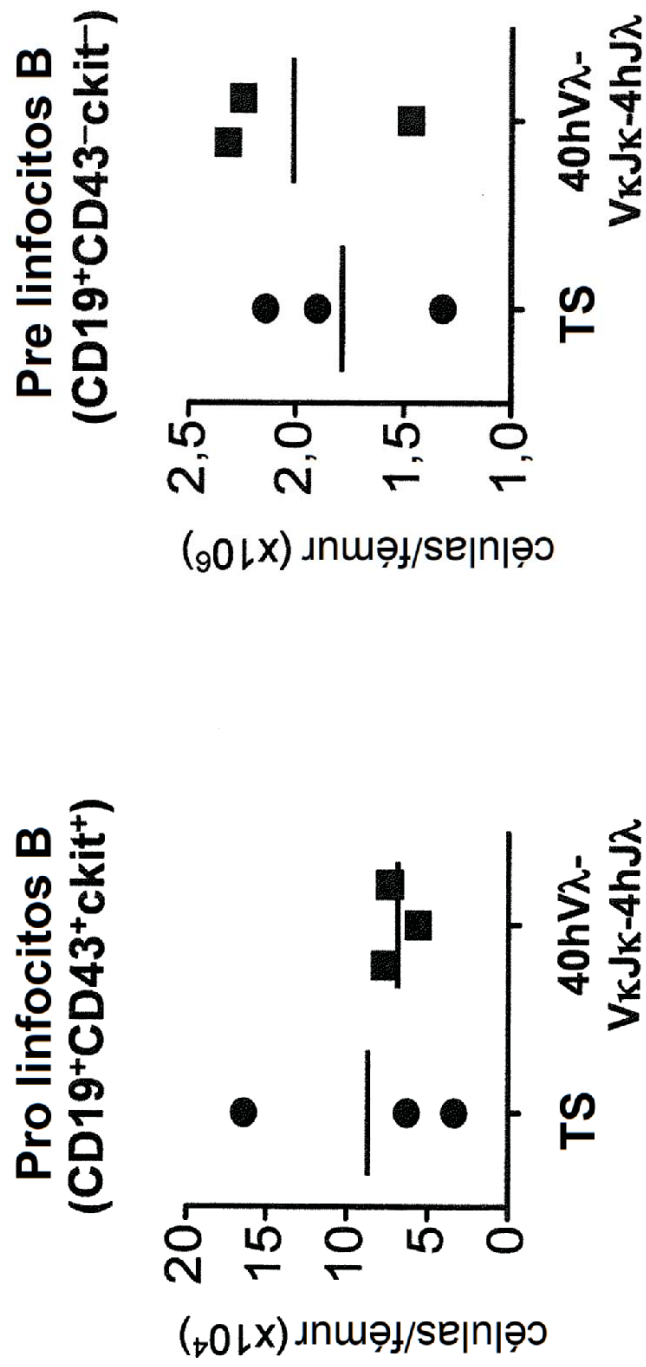


FIG. 28B

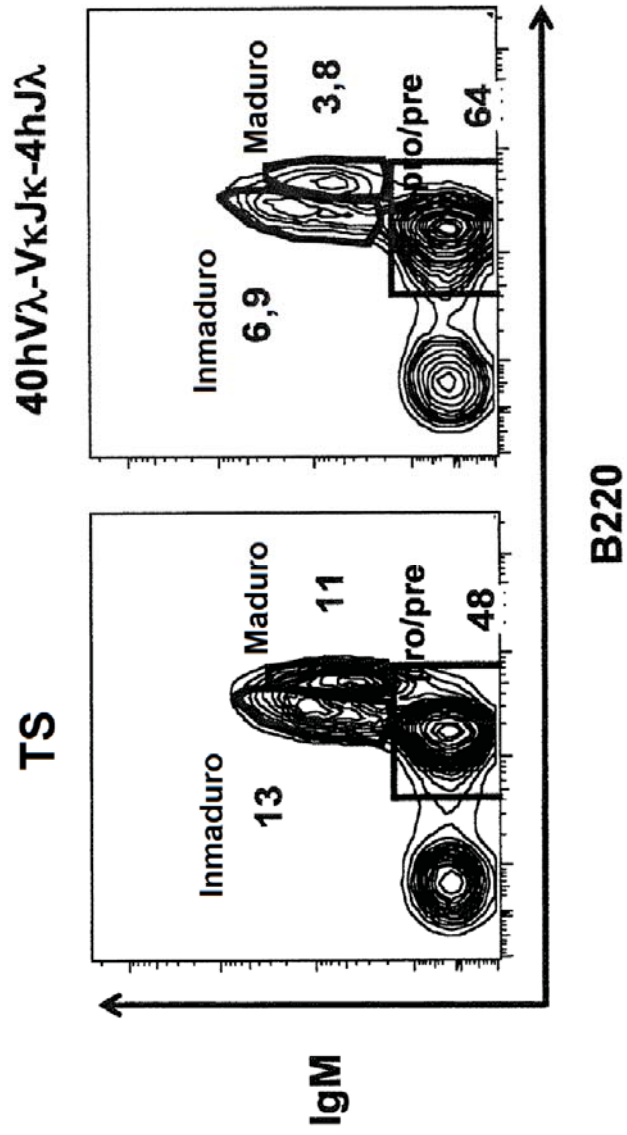


FIG. 28C

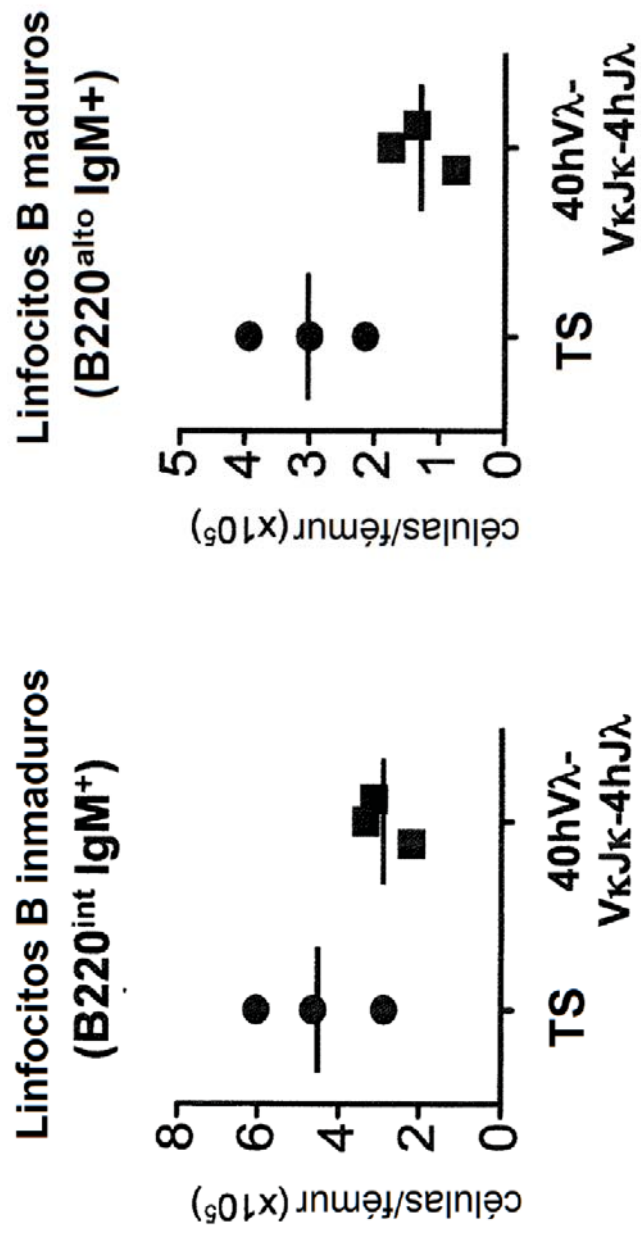


FIG. 28D

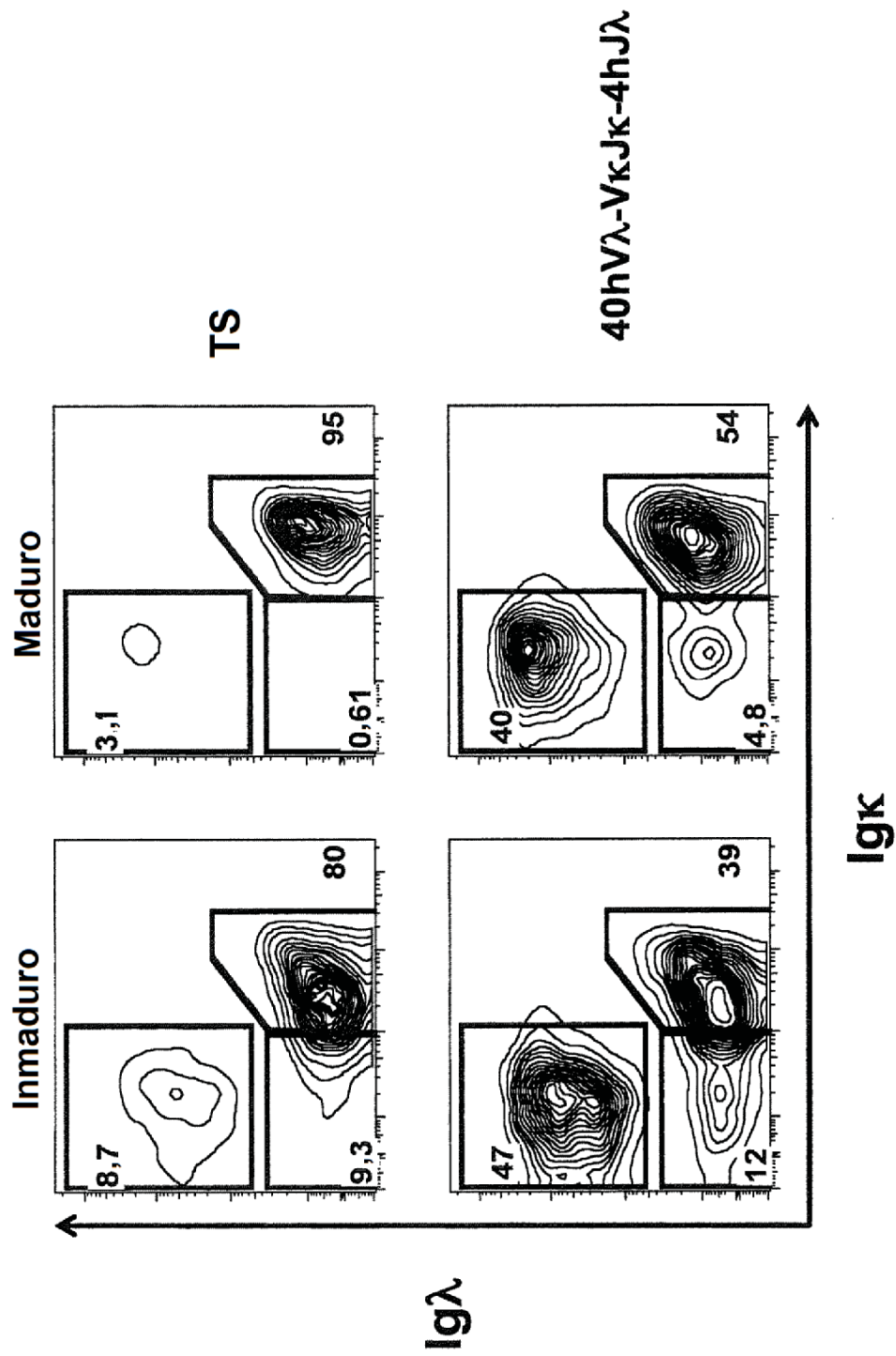


FIG. 28E

	Vλ humano 3'	Jλ1 humano	Cκ de ratón 5'
A6	GCAACAATT	tCGTCTTCGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
B6	GCAACAATT	ATGTCTTCGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
F6	GCAACAATT	ATGTCTTCGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
B7	GCAACAATT	ATGTCTTCGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
E7	GCAACAAT	GTCTTCGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
F7	GCAACAATT	ATGTCTTCGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
C8	GCAACAATT	ATGTCTTCGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
E12	CAAGTCGGTT	gTGTCTTCGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
1-4	TGAGTGCT	TATGTCTTCGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
1-20	TGAGTGCG	gccttttTtGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
3B43	CTGAATGGT	TATGTCTTCGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
5-8	AGTGGTAAT	CATGTCTTCGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
5-19	AGTGGTGCT	TATGTCTTCGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
1010	AGCAGCACT	TATGTCTTCGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
11A1	AGCAGCGCT	TATGTCTTCGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
7A8	GGTGGTGCT	TATGTCTTCGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
3A3	AGTAGCACT	TATGTCTTCGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
2-7	AGCAGCACT	TATGTCTTCGGAAC	TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
FWR4		F G T G T K V T V L G A D A A P T V S I F	

FIG. 29

	Vλ humano 3'	Jλ humano	Cκ de ratón 5'
5-2	CAGCCTGAGTGGTTC	TGTGTTCGGAGGAGGCACCCGGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-5	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
1-3	CAGCCTGAAATGGT	GCTGTGTTCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4B-1	CAGCCTGAGTGGTC	GGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
3B-5	CAGCAGCACTGC	TGTGTTCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
7A-1	CAGCAGTGGTAAT	GCTGTGTTCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-1	CAGCAGTGGTAATCATAG	GGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4A-1	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
11A-1	CAGCAGCGCT	GTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-7	CTACTATGGTGGTCTC	GGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-4	CTCCTATAGTGGTGTCTCGa	GTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-3	GAGCAACTTCGTGT	CTGTGTTCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
FWR4		F G G G T K L T V L G A D A A P T V S I	

FIG. 30

	Vλ humano 3'	Jλ1 humano	Cλ2 de ratón 5'
2D1	GCAGGCAGCAACAATTta	aGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GTCAGCCCCAAGTCCACTCCCCACTCTC
2D9	GACAGCAGTGGTAATCAT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GTCAGCCCCAAGTCCACTCCCCACTCTC
3E15	GACAGCAGCACTGCC	GTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GTCAGCCCCAAGTCCACTCCCCACTCTC
FWR4		F G T G T K V T V L G Q P K S T P T L	

FIG. 31