



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112013021771-5 B1



(22) Data do Depósito: 24/02/2012

(45) Data de Concessão: 16/11/2022

(54) Título: MÉTODO EX VIVO PARA PRODUZIR CAMUNDONGO GENETICAMENTE MODIFICADO PELA INSERÇÃO DE GENE ADAM6 E MÉTODO EX VIVO PARA PRODUZIR ANTICORPO ESPECÍFICO PARA ANTÍGENO DE INTERESSE

(51) Int.Cl.: C12N 15/85; A01K 67/027; C12N 9/64.

(30) Prioridade Unionista: 06/02/2012 US 61/595,200; 16/06/2011 US 61/497,650; 25/02/2011 US 61/446,895.

(73) Titular(es): REGENERON PHARMACEUTICALS, INC..

(72) Inventor(es): LYNN MACDONALD; SEAN STEVENS; ANDREW J. MURPHY.

(86) Pedido PCT: PCT US2012026416 de 24/02/2012

(87) Publicação PCT: WO 2012/141798 de 18/10/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 26/08/2013

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUZIR UM CAMUNDONGO GENETICAMENTE MODIFICADO, HIBRIDOMA E MÉTODO PARA GERAÇÃO DE UM ANTICORPO ESPECÍFICO PARA UM ANTÍGENO DE INTERESSE. São fornecidos camundongos que compreendem uma redução ou deleção da atividade de ADAM6 de um locus de ADAM6 endógeno, ou que não possui um locus endógeno que codifica uma proteína ADAM6 de camundongo, em que os camundongos compreendem uma sequência que codifica uma ADAM6, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento desta, que é funcional em um camundongo-macho. Em uma modalidade, a sequência é uma sequência de ADAM6 ectópica ou uma sequência que confere a um camundongo-macho a habilidade para gerar prole por cruzamento. Camundongos e células com loci modificados geneticamente da cadeia pesada de imunoglobulina que compreendem uma sequência de nucleotídeos ectópica que codifica uma ADAM6 de camundongo, ou fragmento funcional ou homólogo ou ortólogo desta, também são fornecidos.

**MÉTODO *EX VIVO* PARA PRODUZIR CAMUNDONGO GENETICAMENTE
MODIFICADO PELA INSERÇÃO DE GENE *ADAM6* E MÉTODO *EX VIVO*
PARA PRODUZIR ANTICORPO ESPECÍFICO PARA ANTÍGENO DE
INTERESSE**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] Camundongos geneticamente modificados, células, embriões e tecidos que compreendem uma sequência de ácido nucléico que codifica um locus de *ADAM6* funcional são descritos. As modificações incluem loci de imunoglobulina humanos e/ou humanizados. São descritos camundongos que não possuem um gene de *ADAM6* endógeno funcional, mas que compreendem função de *ADAM6*, incluindo camundongos que compreendem uma sequência de ácido nucléico ectópica que codifica uma proteína *ADAM6*. São descritos camundongos-machos geneticamente modificados que compreendem uma modificação de um locus V_H endógeno de imunoglobulina que torna o camundongo incapaz de produzir uma proteína *ADAM6* funcional e resulta em uma perda da fertilidade, e que ainda compreendem função de *ADAM6* nos camundongos-machos, incluindo camundongos que compreendem uma sequência de ácido nucléico ectópica que restaura a fertilidade ao camundongo-macho.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Camundongos que contêm genes de anticorpo humano são conhecidos na técnica. Aplicações farmacêuticas para anticorpos nas últimas duas décadas tiveram um grande impulso nas pesquisas de produção de anticorpos que sejam adequados para uso como substâncias terapêuticas humanas. As substâncias terapêuticas de anticorpo iniciais, que se baseavam em anticorpos de camundongo, não eram ideais como

substâncias terapêuticas humanas, pois a administração repetida de anticorpos de camundongo para humanos resulta em imunogenicidade que pode perturbar os regimes de tratamento de longo prazo. Foram desenvolvidas soluções baseadas na humanização de anticorpos de camundongo para fazer com que eles pareçam mais humanos e menos camundongo-like. Métodos para expressão de sequências de imunoglobulina humana para uso em anticorpos se seguiram, baseados principalmente na expressão *in vitro* de bibliotecas de imunoglobulinas humanas em fago, bactérias ou levedura. Finalmente, foram feitas tentativas para produzir anticorpos humanos úteis a partir de linfócitos humanos *in vitro*, em camundongos enxertados com células hematopoiéticas humanas, e em camundongos transcromossômicos ou transgênicos com loci endógenos de imunoglobulina inativados. Nos camundongos transgênicos, foi necessário desativar os genes endógenos de imunoglobulina de camundongo de modo que os transgenes completamente humanos integrados aleatoriamente funcionassem como a fonte de sequências de imunoglobulina expressas no camundongo. Esses camundongos podem produzir anticorpos humanos adequados para uso como substâncias terapêuticas humanas, mas esses camundongos exibem problemas substanciais com seus sistemas imunes. Esses problemas: (1) tornam os camundongos impraticáveis para geração de um repertório de anticorpos suficientemente diverso, (2) exigem o uso de consertos de reengenharia intensos, (3) fornecem um processo de seleção clonal subótimo, provavelmente em consequência de incompatibilidade entre elementos humanos e de camundongos,

e (4) tornam esses camundongos uma fonte inconfiável de populações grandes e diversas de sequências variáveis humanas que precisam ser realmente úteis para produção de substâncias terapêuticas humanas.

[003] Permanece uma necessidade na técnica para a produção de camundongos geneticamente modificados aprimorados que sejam úteis na geração de sequências de imunoglobulina, incluindo sequências de anticorpo humano. Também permanece uma necessidade por camundongos que sejam capazes de rearranjo de segmentos do gene de imunoglobulina para formar genes de imunoglobulina rearranjados úteis, ou capazes de produzir proteínas a partir de loci de imunoglobulina alterados, enquanto reduzem ou eliminam, ao mesmo tempo, alterações deletérias que possam resultar das modificações genéticas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[004] Em um aspecto, são fornecidas construções de ácido nucléico, células, embriões, camundongos e métodos para produção de camundongos que compreendem uma modificação que resulta em uma proteína ADAM6 ou gene de ADAM6 endógeno não funcional de camundongo (por exemplo, um *knockout* ou uma deleção em um gene de ADAM6 endógeno), em que os camundongos compreendem uma sequência de ácido nucléico que codifica uma proteína ADAM6, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento desta, que é funcional em um camundongo-macho.

[005] Em um aspecto, são fornecidas construções de ácido nucléico, células, embriões, camundongos e métodos para produção de camundongos que compreendem uma modificação de um locus endógeno de imunoglobulina de

camundongo, em que os camundongos compreendem uma proteína ADAM6, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento desta, que é funcional em um camundongo-macho. Em uma modalidade, o locus endógeno de imunoglobulina de camundongo é um locus da cadeia pesada de imunoglobulina, e a modificação reduz ou elimina atividade de ADAM6 de uma célula ou tecido de um camundongo-macho.

[006] Em um aspecto, são fornecidos camundongos que compreendem uma sequência de nucleotídeos ectópica que codifica uma ADAM6 de camundongo ou ortólogo ou homólogo ou fragmento funcional desta; também são fornecidos camundongos que compreendem uma sequência de nucleotídeos endógena que codifica uma ADAM6 de camundongo ou ortólogo ou homólogo ou fragmento desta, e pelo menos uma modificação genética de um locus da cadeia pesada de imunoglobulina.

[007] Em um aspecto, são fornecidos métodos para produção de camundongos que compreendem uma modificação de um locus endógeno de imunoglobulina de camundongo, em que os camundongos compreendem uma proteína ADAM6, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento desta, que é funcional em um camundongo-macho. Camundongos de acordo com a invenção podem ser obtidos, por exemplo, pelos métodos aqui descritos.

[008] Em um aspecto, são fornecidos métodos para produção de camundongos que compreendem uma modificação genética de um locus da cadeia pesada de imunoglobulina, em que a aplicação dos métodos resulta em camundongos-machos que compreendem um locus da cadeia pesada de imunoglobulina modificado (ou uma deleção deste), e os camundongos-machos

são capazes de gerar prole por cruzamento. Em uma modalidade, os camundongos-machos são capazes de produzir esperma que pode transitar do útero de um camundongo através de um oviduto de camundongo para fertilizar um óvulo de camundongo.

[009] Em um aspecto, são fornecidos métodos para produção de camundongos que compreendem uma modificação genética de um locus da cadeia pesada de imunoglobulina, em que a aplicação dos métodos resulta em camundongos-machos que compreendem um locus da cadeia pesada de imunoglobulina modificado (ou uma deleção deste), e os camundongos-machos exibem uma redução na fertilidade, e os camundongos compreendem uma modificação genética que restaura totalmente ou em parte a redução na fertilidade. Em várias modalidades, a redução na fertilidade é caracterizada por uma incapacidade do esperma dos camundongos-machos para migrar do útero de um camundongo através de um oviduto de camundongo para fertilizar um óvulo de camundongo. Em várias modalidades, a redução na fertilidade é caracterizada por esperma que exibe um defeito de migração *in vivo*. Em várias modalidades, a modificação genética que restaura totalmente ou em parte a redução na fertilidade é uma sequência de ácido nucléico que codifica um gene de ADAM6 de camundongo ou ortólogo ou homólogo ou fragmento deste que é funcional em um camundongo-macho.

[0010] Em uma modalidade, a modificação genética compreende a substituição de loci variáveis de cadeia pesada de imunoglobulina endógenos com loci variáveis de cadeia pesada de imunoglobulina de outra espécie (por exemplo, uma espécie que não seja camundongo). Em uma

modalidade, a modificação genética compreende a inserção de loci variáveis de cadeia pesada de imunoglobulina ortólogos em loci variáveis de cadeia pesada de imunoglobulina endógenos. Em uma modalidade específica, a espécie é humana. Em uma modalidade, a modificação genética compreende a deleção de um locus variável de cadeia pesada de imunoglobulina endógeno totalmente ou em parte, em que a deleção resulta em uma perda da função endógena de ADAM6. Em uma modalidade específica, a perda da função endógena de ADAM6 está associada a uma redução na fertilidade em camundongos-machos.

[0011] Em um aspecto, são fornecidos camundongos que compreendem uma modificação que reduz ou elimina a expressão de ADAM6 de camundongo de um alelo de ADAM6 endógeno, de tal forma que um camundongo-macho que possui a modificação exibe uma fertilidade reduzida (por exemplo, uma habilidade altamente reduzida para gerar prole por cruzamento), ou é essencialmente infértil, em função da redução ou eliminação da função endógena de ADAM6, em que os camundongos ainda compreendem uma sequência de ADAM6 ectópica ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional desta. Em um aspecto, a modificação que reduz ou elimina a expressão de ADAM6 de camundongo é uma modificação (por exemplo, uma inserção, uma deleção, uma substituição etc.) em um locus de imunoglobulina de camundongo.

[0012] Em uma modalidade, a redução ou perda da função de ADAM6 compreende uma incapacidade ou incapacidade substancial do camundongo para produzir esperma que possa se deslocar do útero de um camundongo através de um oviduto de camundongo para fertilizar um óvulo de camundongo. Em

uma modalidade específica, pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% do células do esperma produzidas em um volume de ejaculado do camundongo são incapazes de passar através de um oviduto in vivo após copulação e fertilização de um óvulo de camundongo.

[0013] Em uma modalidade, a redução ou perda da função de ADAM6 compreende uma incapacidade para formar ou incapacidade substancial para formar um complexo de ADAM2 e/ou ADAM 3 e/ou ADAM6 em uma superfície de uma célula do esperma do camundongo. Em uma modalidade, a perda da função de ADAM6 compreende uma incapacidade substancial para fertilizar um óvulo de camundongo por copulação com um camundongo-fêmea.

[0014] Em um aspecto, é fornecido um camundongo desprovido de um gene de ADAM6 endógeno funcional, e compreende uma proteína (ou uma sequência de nucleotídeos ectópica que codifica uma proteína) que confere funcionalidade de ADAM6 no camundongo. Em uma modalidade, o camundongo é um camundongo-macho e a funcionalidade compreende fertilidade aumentada, comparado com um camundongo desprovido de um gene de ADAM6 endógeno funcional.

[0015] Em uma modalidade, a proteína é codificada por uma sequência genômica localizada dentro de um locus de imunoglobulina na linhagem germinativa do camundongo. Em uma modalidade específica, o locus de imunoglobulina é um locus da cadeia pesada. Em outra modalidade específica, o locus da cadeia pesada compreende pelo menos um segmento gênico VH humano, pelo menos um segmento gênico DH humano e pelo menos um segmento gênico JH humano. Em uma modalidade,

a proteína ectópica é codificada por uma sequência genômica localizada dentro de um locus não-imunoglobulina na linhagem germinativa do camundongo. Em uma modalidade, o locus não-imunoglobulina é um locus transcricionalmente ativo. Em uma modalidade específica, o locus transcricionalmente ativo é o locus ROSA26. Em uma modalidade específica, o locus transcricionalmente ativo está associado à expressão tecido-específica. Em uma modalidade, a expressão tecido-específica está presente em tecidos reprodutivos. Em uma modalidade, a proteína é codificada por uma sequência genômica inserida aleatoriamente na linhagem germinativa do camundongo.

[0016] Em uma modalidade, o camundongo compreende uma cadeia leve humana ou quimérica humana/de camundongo ou quimérica humana/de rato (por exemplo, variável humana, constante de camundongo ou rato) e uma cadeia pesada quimérica variável humana/constante de camundongo ou rato. Em uma modalidade específica, o camundongo compreende um transgene que compreende um gene da cadeia leve quimérica variável humana/constante de rato ou camundongo ligado operacionalmente a um promotor transcricionalmente ativo, por exemplo, um promotor de ROSA26. Em uma modalidade específica adicional, o transgene da cadeia leve quimérica humana/de camundongo ou rato compreende uma sequência da região variável da cadeia leve humana rearranjada na linhagem germinativa do camundongo.

[0017] Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos ectópica está localizada dentro de um locus de imunoglobulina na linhagem germinativa do camundongo. Em uma modalidade específica, o locus de imunoglobulina é um

locus da cadeia pesada. Em uma modalidade, o locus da cadeia pesada compreende pelo menos um segmento gênico VH humano, pelo menos um segmento gênico DH humano e pelo menos um segmento gênico JH humano. Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos ectópica está localizada dentro de um locus não-imunoglobulina na linhagem germinativa do camundongo. Em uma modalidade, o locus não-imunoglobulina é um locus transcricionalmente ativo. Em uma modalidade específica, o locus transcricionalmente ativo é o locus ROSA26. Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos ectópica está posicionada inserida aleatoriamente na linhagem germinativa do camundongo.

[0018] Em um aspecto, é fornecido um camundongo desprovido de um gene de ADAM6 endógeno funcional, em que o camundongo compreende uma sequência de nucleotídeos ectópica que complementa a perda de função de ADAM6 de camundongo. Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos ectópica confere ao camundongo uma habilidade para produzir prole que é comparável a um camundongo do tipo selvagem correspondente que contém um gene de ADAM6 endógeno funcional. Em uma modalidade, a sequência confere ao camundongo uma habilidade para formar um complexo de ADAM2 e/ou ADAM3 e/ou ADAM6 na superfície de célula do esperma do camundongo. Em uma modalidade, a sequência confere ao camundongo uma habilidade para se deslocar do útero de um camundongo através de um oviduto de camundongo até um óvulo de camundongo para fertilizar o óvulo.

[0019] Em uma modalidade, o camundongo desprovido do gene de ADAM6 endógeno funcional e que compreende a sequência de nucleotídeos ectópica produz pelo menos cerca

de 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% do número de ninhadas que um camundongo do tipo selvagem da mesma idade e cepa produz em um período de tempo de seis meses.

[0020] Em uma modalidade, o camundongo desprovido do gene de ADAM6 endógeno funcional e que compreende a sequência de nucleotídeos ectópica produz pelo menos cerca de 1,5 vez, cerca de 2 vezes, cerca de 2,5 vezes, cerca de 3 vezes, cerca de 4 vezes, cerca de 6 vezes, cerca de 7 vezes, cerca de 8 vezes ou cerca de 10 vezes ou mais prole quando cruzado ao longo de um período de tempo de seis meses do que um camundongo da mesma idade e da mesma cepa ou de cepa similar desprovido do gene de ADAM6 endógeno funcional e desprovido da sequência de nucleotídeos ectópica que é cruzado ao longo substancialmente do mesmo período de tempo e sob substancialmente as mesmas condições.

[0021] Em uma modalidade, o camundongo desprovido do gene de ADAM6 endógeno funcional e que compreende a sequência de nucleotídeos ectópica produz uma média de pelo menos cerca de 2 vezes, 3 vezes ou 4 vezes mais o número de filhotes por ninhada em um período de cruzamento de 4 ou 6 meses do que um camundongo desprovido do gene de ADAM6 endógeno funcional e desprovido da sequência de nucleotídeos ectópica, e que é cruzado pelo mesmo período de tempo.

[0022] Em uma modalidade, o camundongo desprovido do gene de ADAM6 endógeno funcional e que compreende a sequência de nucleotídeos ectópica é um camundongo-macho, e o camundongo-macho produz esperma que, quando recuperado de ovidutos cerca de 5-6 horas pós-copulação reflete uma

migração para o oviduto que é pelo menos 10 vezes, pelo menos 20 vezes, pelo menos 30 vezes, pelo menos 40 vezes, pelo menos 50 vezes, pelo menos 60 vezes, pelo menos 70 vezes, pelo menos 80 vezes, pelo menos 90 vezes, 100 vezes, 110 vezes ou 120 vezes ou mais do que um camundongo desprovido do gene de ADAM6 endógeno funcional e desprovido da sequência de nucleotídeos ectópica.

[0023] Em uma modalidade, o camundongo desprovido do gene de ADAM6 endógeno funcional e que compreende a sequência de nucleotídeos ectópica, quando cruzado com um camundongo-fêmea, gera esperma que é capaz de atravessar o útero e entrar e atravessar o oviduto dentro de cerca de 6 horas em uma eficiência que é aproximadamente igual ao esperma de um camundongo do tipo selvagem.

[0024] Em uma modalidade, o camundongo desprovido do gene de ADAM6 endógeno funcional e que compreende a sequência de nucleotídeos ectópica produz cerca de 1,5 vez, cerca de 2 vezes, cerca de 3 vezes ou cerca de 4 vezes ou mais ninhadas em um período de tempo comparável do que um camundongo desprovido do gene de ADAM6 funcional e desprovido da sequência de nucleotídeos ectópica.

[0025] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que compreende em sua linhagem germinativa uma sequência de ácido nucléico não camundongo que codifica uma proteína de imunoglobulina, em que a sequência de imunoglobulina não camundongo compreende uma inserção de um gene de ADAM6 de camundongo ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional deste. Em uma modalidade, a sequência de imunoglobulina não camundongo compreende uma sequência de imunoglobulina humana. Em uma modalidade, a sequência compreende uma

sequência da cadeia pesada de imunoglobulina humana. Em uma modalidade, a sequência compreende uma sequência da cadeia leve de imunoglobulina humana. Em uma modalidade, a sequência compreende um ou mais segmentos gênicos V, um ou mais segmentos gênicos D e um ou mais segmentos gênicos J; em uma modalidade, a sequência compreende um ou mais segmentos gênicos V e um ou mais segmentos gênicos J. Em uma modalidade, os (um ou mais) segmentos gênicos V, D e J, ou um ou mais segmentos gênicos V e J, não estão rearranjados. Em uma modalidade, os (um ou mais) segmentos gênicos V, D e J, ou um ou mais segmentos gênicos V e J, estão rearranjados. Em uma modalidade, após rearranjo dos (um ou mais) segmentos gênicos V, D e J, ou um ou mais segmentos gênicos V e J, o camundongo compreende em seu genoma pelo menos uma sequência de ácido nucléico que codifica um gene de ADAM6 de camundongo ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional deste. Em uma modalidade, após rearranjo, o camundongo compreende em seu genoma pelo menos duas sequências de ácidos nucléicos que codificam um gene de ADAM6 de camundongo ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional deste. Em uma modalidade, após rearranjo, o camundongo compreende em seu genoma pelo menos uma sequência de ácido nucléico que codifica um gene de ADAM6 de camundongo ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional deste. Em uma modalidade, o camundongo compreende o gene de ADAM6, ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional deste, em uma célula B. Em uma modalidade, o camundongo compreende o gene de ADAM6, ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional deste, em uma célula não B.

[0026] Em um aspecto, são fornecidos camundongos que

expressam uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina humana, ou fragmento funcional desta, de um locus endógeno da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo, em que os camundongos compreendem uma atividade de ADAM6 que é funcional em um camundongo-macho.

[0027] Em uma modalidade, os camundongos-machos compreendem um único alelo de ADAM6 endógeno não modificado, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento funcional deste, em um locus de ADAM6 endógeno.

[0028] Em uma modalidade, os camundongos-machos compreendem uma sequência de ADAM6 de camundongo ectópica, ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional desta, que codifica uma proteína que confere função de ADAM6.

[0029] Em uma modalidade, os camundongos-machos compreendem uma sequência de ADAM6, ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional desta, em uma localização no genoma do camundongo que se aproxima da localização do alelo endógeno de ADAM6 de camundongo, por exemplo, 3' de uma sequência do segmento gênico V final e 5' de um segmento gênico D inicial.

[0030] Em uma modalidade, os camundongos-machos compreendem uma sequência de ADAM6, ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional desta, flanqueada acima, abaixo, ou acima e abaixo (com relação à direção de transcrição da sequência de ADAM6) de uma sequência de ácido nucléico que codifica um segmento gênico variável de imunoglobulina. Em uma modalidade específica, o segmento gênico variável de imunoglobulina é um segmento gênico humano. Em uma modalidade, o segmento gênico variável de imunoglobulina é um segmento gênico humano, e a sequência que codifica a

ADAM6 de camundongo, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento desta, funcional em um camundongo está entre os segmentos gênicos V humanos; em uma modalidade, o camundongo compreende dois ou mais segmentos gênicos V humanos, e a sequência está em uma posição entre o segmento gênico V final e o penúltimo segmento gênico V; em uma modalidade, a sequência está em uma posição após o segmento gênico V final e o primeiro segmento gênico D.

[0031] Em um aspecto, é fornecido um camundongo-macho que compreende um gene de ADAM6 endógeno não funcional, ou uma deleção de um gene de ADAM6 endógeno, em sua linhagem germinativa; em que as células do esperma do camundongo são capazes de atravessar um oviduto de um camundongo-fêmea e fertilizar um óvulo. Em uma modalidade, os camundongos compreendem uma cópia extracromossômica de um gene de ADAM6 de camundongo, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento funcional deste, que é funcional em um camundongo-macho. Em uma modalidade, os camundongos compreendem um gene de ADAM6 de camundongo ectópico, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento funcional deste, que é funcional em um camundongo-macho.

[0032] Em um aspecto, são fornecidos camundongos que compreendem uma modificação genética que reduz a função endógena de ADAM6 de camundongo, em que o camundongo compreende pelo menos alguma funcionalidade de ADAM6 fornecida por um alelo endógeno não modificado que é funcional totalmente ou em parte (por exemplo, um heterozigoto), ou por expressão por uma sequência ectópica que codifica uma ADAM6, ou um ortólogo ou homólogo ou fragmento funcional desta, que é funcional em um

camundongo-macho.

[0033] Em uma modalidade, os camundongos compreendem função de ADAM6 suficiente para conferir ao camundongos-machos a habilidade para gerar prole por cruzamento, comparados com camundongos-machos que não possuem uma ADAM6 funcional. Em uma modalidade, a função de ADAM6 é conferida pela presença de uma sequência de nucleotídeos ectópica que codifica uma ADAM6 de camundongo ou um homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional desta. Homólogos ou ortólogos de ADAM6 ou fragmentos destes que são funcionais em um camundongo-macho incluem aqueles que restauram, totalmente ou em parte, a perda da habilidade para gerar prole observada em um camundongo-macho desprovido de atividade endógena de ADAM6 de camundongo suficiente, por exemplo, a perda na habilidade observada em um camundongo com knockout de ADAM6. Nesse sentido, camundongos com knockout de ADAM6 incluem camundongos que compreendem um locus endógeno ou fragmento deste, mas que não é funcional, ou seja, que não expressa ADAM6 (ADAM6a e/ou ADAM6b) de forma alguma, ou que expressa ADAM6 (ADAM6a e/ou ADAM6b) em um nível que é insuficiente para suportar uma habilidade essencialmente normal para gerar prole de um camundongo-macho do tipo selvagem. A perda de função pode ser causada, por exemplo, por uma modificação em um gene estrutural do locus (ou seja, em uma região codificadora de ADAM6a ou ADAM6b) ou em uma região reguladora do locus (por exemplo, em uma sequência 5' ao gene de ADAM6a, ou 3' da região codificadora de ADAM6a ou ADAM6b, em que a sequência controla, totalmente ou em parte, a transcrição de um gene de ADAM6, a expressão de um RNA de ADAM6 ou a expressão de

uma proteína ADAM6). Em várias modalidades, ortólogos ou homólogos ou fragmentos destes que são funcionais em um camundongo-macho são aqueles que permitem que um esperma de um camundongo-macho (ou uma maioria de células do esperma no ejaculado de um camundongo-macho) transite um oviduto de camundongo e fertilize um óvulo de camundongo.

[0034] Em uma modalidade, camundongos-machos que expressam a região variável de imunoglobulina humana ou fragmento funcional desta compreendem atividade de ADAM6 suficiente para conferir aos camundongos-machos a habilidade para gerar prole por cruzamento com camundongos-fêmeas e, em uma modalidade, os camundongos-machos exibem uma habilidade para gerar uma prole quando cruzam com camundongos-fêmeas que é, em uma modalidade ,pelo menos 25%, em uma modalidade pelo menos 30%, em uma modalidade pelo menos 40%, em uma modalidade pelo menos 50%, em uma modalidade pelo menos 60%, em uma modalidade pelo menos 70%, em uma modalidade pelo menos 80%, em uma modalidade pelo menos 90% e em uma modalidade aproximadamente igual àquela de camundongos com um ou dois alelos endógenos não modificados de ADAM6.

[0035] Em uma modalidade, camundongos-machos expressam ADAM6 suficiente (ou um ortólogo ou homólogo ou fragmento funcional desta) para permitir que uma célula do esperma dos camundongos-machos atravesse um oviduto do camundongo-fêmea e fertilize um óvulo de camundongo.

[0036] Em uma modalidade, a funcionalidade de ADAM6 é conferida por uma sequência de ácido nucléico que é contígua com uma sequência cromossômica de camundongo (por exemplo, o ácido nucléico é integrado aleatoriamente em um

cromossomo de camundongo; ou colocado em uma localização específica, por exemplo, por direcionamento do ácido nucléico a uma localização específica, por exemplo, por inserção ou recombinação homóloga sítio-específica mediada por recombinase (por exemplo, mediada por Cre)). Em uma modalidade, a sequência de ADAM6 está presente em um ácido nucléico que é distinto de um cromossomo do camundongo (por exemplo, a sequência de ADAM6 está presente em um episssomo, ou seja, de forma extracromossômica, por exemplo, em uma construção de expressão, um vetor, um YAC, um transcromossomo etc.).

[0037] Em um aspecto, são fornecidos camundongos geneticamente modificados e células que compreendem uma modificação de um locus endógeno da cadeia pesada de imunoglobulina, em que os camundongos expressam pelo menos uma porção de uma sequência da cadeia pesada de imunoglobulina, por exemplo, pelo menos uma porção de uma sequência humana, em que os camundongos compreendem uma atividade de ADAM6 que é funcional em um camundongo-macho. Em uma modalidade, a modificação reduz ou erradica a atividade de ADAM6 do camundongo. Em uma modalidade, o camundongo é modificado de tal forma que ambos os alelos que codificam a atividade de ADAM6 estejam ausentes ou expressem uma ADAM6 que não funciona substancialmente para suportar cruzamento normal em um camundongo-macho. Em uma modalidade, o camundongo ainda compreende uma sequência de ácido nucléico ectópica que codifica uma ADAM6 de camundongo ou ortólogo ou homólogo ou fragmento funcional desta.

[0038] Em um aspecto, são fornecidos camundongos

geneticamente modificados e células que compreendem uma modificação de um locus endógeno da cadeia pesada de imunoglobulina, em que a modificação reduz ou elimina a atividade de ADAM6 expressa por uma sequência de ADAM6 do locus, e em que os camundongos compreendem uma proteína ADAM6 ou ortólogo ou homólogo ou fragmento funcional desta. Em várias modalidades, a proteína ADAM6 ou fragmento desta é codificada por uma sequência de ADAM6 ectópica. Em várias modalidades, a proteína ADAM6 ou fragmento desta é expressa por um alelo de ADAM6 endógeno. Em várias modalidades, o camundongo compreende um primeiro alelo da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende uma primeira modificação que reduz ou elimina a expressão de uma ADAM6 funcional pelo primeiro alelo da cadeia pesada de imunoglobulina, e o camundongo compreende um segundo alelo da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende uma segunda modificação que não reduz substancialmente ou que não elimina a expressão de uma ADAM6 funcional pelo segundo alelo da cadeia pesada de imunoglobulina.

[0039] Em uma modalidade, a segunda modificação está localizada 3' (com relação à direcionalidade transcricional do segmento gênico V de camundongo) de um segmento gênico V final de camundongo e localizada 5' (com relação à direcionalidade transcricional da sequência constante) de um gene constante da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo (ou quimérico humano/de camundongo) ou fragmento deste (por exemplo, uma sequência de ácido nucléico que codifica uma C_H1 e/ou dobradiça e/ou C_H2 e/ou C_H3 humana e/ou de camundongo).

[0040] Em uma modalidade, a modificação está em um

primeiro alelo da cadeia pesada de imunoglobulina em um primeiro locus que codifica um primeiro alelo de ADAM6, e a função de ADAM6 resulta da expressão de uma ADAM6 endógena em um segundo alelo da cadeia pesada de imunoglobulina em um segundo locus que codifica uma ADAM6 funcional, em que o segundo alelo da cadeia pesada de imunoglobulina compreende pelo menos uma modificação de um segmento gênico V, D e/ou J. Em uma modalidade específica, a (pelo menos uma) modificação do segmento gênico V, D e/ou J é uma deleção, uma substituição com um segmento gênico V, D e/ou J humano, uma substituição com um segmento gênico V, D e/ou J de camélídeo, uma substituição com um segmento gênico V, D e/ou J humanizado ou camelizado, uma substituição de uma sequência da cadeia pesada com uma sequência da cadeia leve, e uma combinação destas. Em uma modalidade, a (pelo menos uma) modificação é a deleção de um ou mais segmentos gênicos V, D e/ou J da cadeia pesada e uma substituição com um ou mais segmentos gênicos V e/ou J da cadeia leve (por exemplo, um segmento gênico V e/ou J da cadeia leve humana) no locus da cadeia pesada.

[0041] Em uma modalidade, a modificação está em um primeiro alelo da cadeia pesada de imunoglobulina em um primeiro locus e um segundo alelo da cadeia pesada de imunoglobulina em um segundo locus, e a função de ADAM6 resulta da expressão de uma ADAM6 ectópica em um locus não-imunoglobulina na linhagem germinativa do camundongo. Em uma modalidade específica, o locus não-imunoglobulina é o locus ROSA26. Em uma modalidade específica, o locus não-imunoglobulina está transcritionalmente ativo no tecido reprodutivo.

[0042] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que compreende um knockout heterozigoto ou homozigoto de ADAM6. Em uma modalidade, o camundongo ainda compreende uma sequência de imunoglobulina modificada que é uma sequência de imunoglobulina humana ou humanizada, ou uma sequência de imunoglobulina de camelídeo ou humana camelizada ou de camundongo. Em uma modalidade, a sequência de imunoglobulina modificada está presente no locus endógeno da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo. Em uma modalidade, a sequência de imunoglobulina modificada compreende uma sequência gênica variável da cadeia pesada humana em um locus endógeno da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo. Em uma modalidade, a sequência gênica variável da cadeia pesada humana substitui uma sequência gênica variável da cadeia pesada de camundongo endógena no locus endógeno da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo.

[0043] Em um aspecto, é fornecido um camundongo incapaz de expressar uma ADAM6 endógena funcional de camundongo por um locus endógeno de ADAM6 de camundongo. Em uma modalidade, o camundongo compreende uma sequência de ácido nucléico ectópica que codifica uma ADAM6, ou fragmento funcional desta, que é funcional no camundongo. Em uma modalidade específica, a sequência de ácido nucléico ectópica codifica uma proteína que resgata uma perda na habilidade para gerar prole exibida por um camundongo-macho que é homozigoto para um knockout de ADAM6. Em uma modalidade específica, a sequência de ácido nucléico ectópica codifica uma proteína ADAM6 de camundongo.

[0044] Em um aspecto, é fornecido um camundongo

desprovido de um locus de ADAM6 endógeno funcional, e que compreende uma sequência de ácido nucléico ectópica que confere ao camundongo a função de ADAM6. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico compreende uma sequência de ADAM6 endógena de camundongo ou fragmento funcional desta. Em uma modalidade, a sequência de ADAM6 endógena de camundongo compreende uma sequência que codifica ADAM6a e ADAM6b localizada em um camundongo do tipo selvagem entre o segmento gênico V da cadeia pesada de imunoglobulina (V_H) de camundongo mais 3' e o segmento gênico D da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo mais 5' (D_H).

[0045] Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico compreende uma sequência que codifica ADAM6a de camundongo ou fragmento funcional desta e/ou uma sequência que codifica ADAM6b de camundongo ou fragmento funcional desta, em que o(s) fragmento (s) ADAM6a e/ou ADAM6b ou funcional desta está ligado operacionalmente a um promotor. Em uma modalidade, o promotor é um promotor humano. Em uma modalidade, o promotor é o promotor de ADAM6 de camundongo. Em uma modalidade específica, o promotor de ADAM6 compreende uma sequência localizada entre o primeiro códon do primeiro gene de ADAM6 mais perto do segmento gênico D_H de camundongo mais 5' e a sequência sinalizadora de recombinação do segmento gênico D_H mais 5', em que 5' é indicado com relação à direção de transcrição dos genes de imunoglobulina de camundongo. Em uma modalidade, o promotor é um promotor viral. Em uma modalidade específica, o promotor viral é um promotor de citomegalovírus (CMV). Em uma modalidade, o promotor é um promotor de ubiquitina.

[0046] Em uma modalidade, o promotor é um promotor

indutível. Em uma modalidade, o promotor indutível regula a expressão em tecidos não reprodutivos. Em uma modalidade, o promotor indutível regula a expressão em tecidos reprodutivos. Em uma modalidade específica, a expressão das sequências de ADAM6a e/ou ADAM6b de camundongo ou fragmentos funcionais destas é regulada pelo desenvolvimento pelo promotor indutível em tecidos reprodutivos.

[0047] Em uma modalidade, a ADAM6a e/ou ADAM6b de camundongo é selecionada da ADAM6a do ID. DE SEQ. N°: 1 e/ou ADAM6b da sequência do ID. DE SEQ. N°: 2. Em uma modalidade, o promotor de ADAM6 de camundongo é um promotor do ID. DE SEQ. N°: 3. Em uma modalidade específica, o promotor de ADAM6 de camundongo compreende a sequência de ácido nucléico do ID. DE SEQ. N°: 3 diretamente acima (com relação à direção de transcrição de ADAM6a) do primeiro códon de ADAM6a e se estende até o final do ID. DE SEQ. N°: 3 acima da região codificadora de ADAM6. Em outra modalidade específica, o promotor de ADAM6 é um fragmento que se estende de dentro de cerca de 5 até cerca de 20 nucleotídeos acima do códon de partida de ADAM6a até cerca de 0,5 kb, 1 kb, 2 kb ou 3 kb ou mais acima do códon de partida de ADAM6a.

[0048] Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico compreende ID. DE SEQ. N°: 3 ou um fragmento desta que, quando colocada em um camundongo que é infértil ou que possui baixa fertilidade em função de uma ausência de ADAM6, aumenta a fertilidade ou restaura a fertilidade até aproximadamente a fertilidade do tipo selvagem. Em uma modalidade, o ID. DE SEQ. N°: 3 ou um fragmento deste

confere a um camundongo-macho a habilidade para produzir uma célula do esperma que é capaz de atravessar um oviduto do camundongo-fêmea a fim de fertilizar um óvulo de camundongo.

[0049] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que compreende uma deleção de uma sequência de nucleotídeos endógena que codifica uma proteína ADAM6, uma substituição de um segmento gênico VH endógeno de camundongo com um segmento gênico VH humano, e uma sequência de nucleotídeos ectópica que codifica uma proteína ADAM6 de camundongo, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento desta, que é funcional em um camundongo-macho.

[0050] Em uma modalidade, o camundongo compreende um locus da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende uma deleção de uma sequência de nucleotídeos do locus endógeno de imunoglobulina que compreende um gene endógeno de ADAM6, compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um ou mais segmentos do gene de imunoglobulina humana, e em que a sequência de nucleotídeos ectópica que codifica a proteína ADAM6 de camundongo está dentro ou diretamente adjacente à sequência de nucleotídeos que codifica os (um ou mais) segmentos do gene de imunoglobulina humana.

[0051] Em uma modalidade, o camundongo compreende uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos VH endógenos com uma sequência de nucleotídeos que codifica um ou mais segmentos gênicos VH humanos, e a sequência de nucleotídeos ectópica que codifica a proteína ADAM6 de camundongo está dentro ou diretamente adjacente à sequência de nucleotídeos que

codifica os (um ou mais) segmentos gênicos VH humanos. Em uma modalidade, o camundongo ainda compreende uma substituição de um ou mais segmentos gênicos DH endógenos com um ou mais segmentos gênicos DH humanos no locus do gene DH endógeno. Em uma modalidade, o camundongo ainda compreende uma substituição de um ou mais segmentos gênicos JH endógenos com um ou mais segmentos gênicos JH humanos no locus do gene JH endógeno. Em uma modalidade, o camundongo compreende uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos VH, DH e JH endógenos e uma substituição nos loci dos genes VH, DH e JH endógenos com segmentos gênicos VH, DH e JH humanos, em que o camundongo compreende uma sequência ectópica que codifica uma proteína ADAM6 de camundongo. Em uma modalidade específica, a sequência ectópica que codifica a proteína ADAM6 de camundongo é colocada entre o penúltimo segmento gênico VH mais 3' dos segmentos gênicos VH humanos presentes, e o último segmento gênico VH 3' dos segmentos gênicos VH humanos presentes. Em uma modalidade específica, o camundongo compreende uma deleção de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos VH de camundongo, e uma substituição com todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos VH humanos, e a sequência de nucleotídeos ectópica que codifica a proteína ADAM6 de camundongo é colocada abaixo do segmento gênico VH1-2 humano e acima do segmento gênico VH6-1 humano.

[0052] Em uma modalidade específica, o camundongo compreende uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos VH endógenos com uma sequência de nucleotídeos que codifica um ou mais segmentos gênicos

VH humanos, e a sequência de nucleotídeos ectópica que codifica a proteína ADAM6 de camundongo está dentro ou diretamente adjacente à sequência de nucleotídeos que codifica os (um ou mais) segmentos gênicos VH humanos.

[0053] Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos ectópica que codifica a proteína ADAM6 de camundongo está presente em um transgene no genoma do camundongo. Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos ectópica que codifica a proteína ADAM6 de camundongo está presente de forma extracromossômica no camundongo.

[0054] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que compreende uma modificação de um locus endógeno da cadeia pesada de imunoglobulina, em que o camundongo expressa uma célula B que compreende uma sequência de imunoglobulina rearranjada ligada operacionalmente a uma sequência gênica da região constante da cadeia pesada, e a célula B compreende em seu genoma (por exemplo, em um cromossomo de célula B) um gene que codifica uma ADAM6, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento desta, que é funcional em um camundongo-macho. Em uma modalidade, a sequência de imunoglobulina rearranjada ligada operacionalmente à sequência gênica da região constante da cadeia pesada compreende uma sequência da cadeia pesada V, D e/ou J humana; uma sequência da cadeia pesada V, D e/ou J de camundongo; uma sequência da cadeia leve V e/ou J humana ou de camundongo. Em uma modalidade, a sequência gênica da região constante da cadeia pesada compreende uma sequência da cadeia pesada humana ou de camundongo selecionada do grupo que consiste em uma CH1, uma dobradiça, uma CH2, uma CH3, e uma combinação destas.

[0055] Em um aspecto, é fornecido um camundongo geneticamente modificado, em que o camundongo compreende um gene da cadeia leve de imunoglobulina funcionalmente silenciado, e ainda compreende uma substituição de um ou mais segmentos gênicos endógenos da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina com um ou mais segmentos do gene da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina humana, em que o camundongo não possui um locus de ADAM6 endógeno funcional, e em que o camundongo compreende uma sequência de nucleotídeos ectópica que expressa uma proteína ADAM6 de camundongo, ou um ortólogo ou homólogo ou fragmento desta, que é funcional em um camundongo-macho.

[0056] Em um aspecto, é fornecido um camundongo desprovido de um locus ou sequência endógena funcional de ADAM6 de camundongo e que compreende uma sequência de nucleotídeos ectópica que codifica um locus de ADAM6 de camundongo ou fragmento funcional de um locus ou sequência de ADAM6 de camundongo, em que o camundongo é capaz de cruzamento com um camundongo do sexo oposto para produzir uma prole que compreende o locus ou sequência de ADAM6 ectópica. Em uma modalidade, o camundongo é macho. Em uma modalidade, o camundongo é fêmea.

[0057] Em um aspecto, é fornecido um camundongo geneticamente modificado, em que o camundongo compreende um segmento do gene da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina humana em um locus endógeno do gene da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo, o camundongo desprovido de uma sequência de ADAM6 funcional endógena no locus endógeno do gene da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina de

camundongo, e em que o camundongo compreende uma sequência de nucleotídeos ectópica que expressa uma proteína ADAM6 de camundongo, ou um ortólogo ou homólogo ou fragmento desta, que é funcional em um camundongo-macho.

[0058] Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos ectópica que expressa a proteína ADAM6 de camundongo é extracromossômica. Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos ectópica que expressa a proteína ADAM6 de camundongo está integrada em um ou mais loci em um genoma de camundongo. Em uma modalidade específica, os (um ou mais) loci incluem um locus de imunoglobulina.

[0059] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que expressa uma sequência da cadeia pesada de imunoglobulina a partir de um locus endógeno modificado da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo, em que a cadeia pesada é derivada de um segmento gênico V humano, um segmento gênico D e um segmento gênico J, em que o camundongo compreende uma atividade de ADAM6 que é funcional no camundongo.

[0060] Em uma modalidade, o camundongo compreende diversos segmentos gênicos V humanos, diversos segmentos gênicos D e diversos segmentos gênicos J. Em uma modalidade, os segmentos gênicos D são segmentos gênicos D humanos. Em uma modalidade, os segmentos gênicos J são segmentos gênicos J humanos. Em uma modalidade, o camundongo ainda compreende uma sequência da região constante da cadeia pesada humanizada, em que a humanização compreende a substituição de uma sequência selecionada de uma CH1, uma dobradiça, uma CH2, uma CH3, e uma combinação destas. Em uma modalidade específica, a cadeia pesada é derivada de um segmento gênico V humano, um segmento gênico

D humano, um segmento gênico J humano, uma sequência de CH1 humana, uma sequência de dobradiça humana ou de camundongo, uma sequência de CH2 de camundongo e uma sequência de CH3 de camundongo. Em outra modalidade específica, o camundongo ainda compreende uma sequência constante da cadeia leve humana.

[0061] Em uma modalidade, o segmento gênico D é flanqueado 5' (com relação à direção transcricional do segmento gênico D) por uma sequência que codifica uma atividade de ADAM6 que é funcional no camundongo.

[0062] Em uma modalidade, a atividade de ADAM6 que é funcional no camundongo resulta da expressão de uma sequência de nucleotídeos localizada 5' do segmento gênico D mais 5' e 3' do segmento gênico V mais 3' (com relação à direção de transcrição do segmento gênico V) do locus endógeno modificado da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo.

[0063] Em uma modalidade, a atividade de ADAM6 que é funcional no camundongo resulta da expressão de uma sequência de nucleotídeos localizada entre dois segmentos gênicos V humanos no locus endógeno modificado da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo. Em uma modalidade, os dois segmentos gênicos V humanos são um segmento gênico VH1-2 humano e a segmento gênico VH6-1.

[0064] Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos compreende uma sequência selecionada de uma sequência de ADAM6b de camundongo ou fragmento funcional desta, uma sequência de ADAM6a de camundongo ou fragmento funcional desta, e uma combinação destas.

[0065] Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos

entre os dois segmentos gênicos V humanos é colocada em orientação de transcrição oposta com relação aos segmentos gênicos V humanos. Em uma modalidade específica, a sequência de nucleotídeos codifica, de 5' para 3' com relação à direção de transcrição de genes de ADAM6, e sequência de ADAM6a, seguida por uma sequência de ADAM6b.

[0066] Em uma modalidade, o camundongo compreende uma substituição de uma sequência do pseudogene de ADAM6 humana entre segmentos gênicos V humanos VH1-2 e VH6-1 com uma sequência de ADAM6 de camundongo ou um fragmento funcional desta.

[0067] Em uma modalidade, a sequência que codifica a atividade de ADAM6 que é funcional no camundongo é uma sequência de ADAM6 de camundongo ou fragmento funcional desta.

[0068] Em uma modalidade, o camundongo compreende um segmento gênico DFL16.1 endógeno de camundongo (por exemplo, em um camundongo heterozigoto para o locus endógeno modificado da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo), ou um segmento gênico DH1-1 humano. Em uma modalidade, o segmento gênico D da cadeia pesada de imunoglobulina expresso pelo camundongo é derivado de um segmento gênico DFL16.1 endógeno de camundongo ou de um segmento gênico DH1-1 humano.

[0069] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que compreende uma sequência de ácido nucléico que codifica uma ADAM6 de camundongo (ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional desta) em uma célula que carrega DNA de linhagem de célula B não rearranjada, mas não compreende a sequência de ácido nucléico que codifica a ADAM6 de camundongo (ou

homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional desta) em uma célula B que compreende loci de imunoglobulina rearranjados, em que a sequência de ácido nucléico que codifica a ADAM6 de camundongo (ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional desta) ocorre no genoma em uma posição que é diferente de uma posição na qual um gene de ADAM6 de camundongo aparece em um camundongo do tipo selvagem. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico que codifica a ADAM6 de camundongo (ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional desta) está presente em todas ou substancialmente todas as células que carregam DNA que não são de linhagem de célula B rearranjada; em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico está presente em células da linhagem germinativa do camundongo, mas não em um cromossomo de uma célula B rearranjada.

[0070] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que compreende uma sequência de ácido nucléico que codifica uma ADAM6 de camundongo (ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional desta) em todas ou substancialmente todas as células que carregam DNA, incluindo células B que compreendem loci de imunoglobulina rearranjados, em que a sequência de ácido nucléico que codifica a ADAM6 de camundongo (ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional desta) ocorre no genoma em uma posição que é diferente de uma posição na qual um gene de ADAM6 de camundongo aparece em um camundongo do tipo selvagem. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico que codifica a ADAM6 de camundongo (ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional desta) é em um ácido nucléico que é contíguo com o lócus de imunoglobulina rearranjado. Em uma modalidade, o ácido

nucléico que é contíguo com o locus de imunoglobulina rearranjado é um cromossomo. Em uma modalidade, o cromossomo é um cromossomo que é encontrado em um camundongo do tipo selvagem e o cromossomo compreende uma modificação de um locus de imunoglobulina de camundongo.

[0071] Em um aspecto, é fornecido um camundongo geneticamente modificado, em que o camundongo compreende uma célula B que compreende em seu genoma uma sequência de ADAM6 ou ortólogo ou homólogo desta. Em uma modalidade, a sequência de ADAM6, ou ortólogo ou homólogo desta, está em um locus da cadeia pesada de imunoglobulina. Em uma modalidade, a sequência de ADAM6, ou ortólogo ou homólogo desta, está em um locus que não é um locus de imunoglobulina. Em uma modalidade, a sequência de ADAM6 é em um transgene dirigido por um promotor heterólogo. Em uma modalidade específica, o promotor heterólogo é um promotor não imunoglobulina. Em uma modalidade específica, a célula B expressa uma proteína ADAM6 ou ortólogo ou homólogo desta.

[0072] Em uma modalidade, 90% ou mais das células B do camundongo compreendem um gene que codifica uma proteína ADAM6 ou um ortólogo desta ou um homólogo desta ou um fragmento desta que é funcional no camundongo. Em uma modalidade específica, o camundongo é um camundongo-macho.

[0073] Em uma modalidade, o genoma da célula B compreende um primeiro alelo e um segundo alelo que compreende a sequência de ADAM6 ou ortólogo ou homólogo desta. Em uma modalidade, o genoma da célula B compreende um primeiro alelo, mas não um segundo alelo que compreende a sequência de ADAM6 ou ortólogo ou homólogo desta.

[0074] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que compreende uma modificação em um ou mais alelos de ADAM6 endógenos.

[0075] Em uma modalidade, a modificação torna o camundongo incapaz de expressar uma proteína ADAM6 funcional por pelo menos um dos (pelo menos um ou mais) alelos de ADAM6 endógenos. Em uma modalidade específica, o camundongo é incapaz de expressar uma proteína ADAM6 funcional por cada um dos alelos de ADAM6 endógenos.

[0076] Em uma modalidade, os camundongos são incapazes de expressar uma proteína ADAM6 funcional de cada alelo de ADAM6 endógeno, e os camundongos compreendem uma sequência de ADAM6 ectópica.

[0077] Em uma modalidade, os camundongos são incapazes de expressar uma proteína ADAM6 funcional de cada alelo de ADAM6 endógeno, e os camundongos compreendem uma sequência de ADAM6 ectópica localizada dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 ou 120 ou mais kb acima (com relação à direção de transcrição do locus da cadeia pesada de camundongo) de uma sequência da região constante da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo. Em uma modalidade específica, a sequência de ADAM6 ectópica está no locus endógeno da cadeia pesada de imunoglobulina (por exemplo, em uma região intergênica V-D, entre dois segmentos gênicos V, entre um segmento gênico V e um D, entre um segmento gênico D e um J etc.). Em uma modalidade específica, a sequência de ADAM6 ectópica está localizada dentro de uma sequência intergênica de 90 a 100 kb entre o segmento gênico V final de camundongo e o primeiro segmento gênico D de camundongo. Em outra modalidade específica, a

sequência intergênica V-D endógena de 90 a 100 kb é removida, e a sequência de ADAM6 ectópica é colocada entre o segmento gênico V final e o primeiro segmento gênico D.

[0078] Em um aspecto, é fornecido um camundongo-macho infértil, em que o camundongo compreende uma deleção de dois ou mais alelos de ADAM6 endógenos. Em um aspecto, é fornecido um camundongo-fêmea que é um veículo de um traço de infertilidade masculina, em que o camundongo-fêmea compreende em sua linhagem germinativa um alelo de ADAM6 não funcional ou um knockout de um alelo de ADAM6 endógeno.

[0079] Em um aspecto, é fornecido um camundongo desprovido de segmentos gênicos V, D e J endógenos da cadeia pesada de imunoglobulina, em que maioria das células B do camundongo compreende uma sequência de ADAM6 ou ortólogo ou homólogo desta.

[0080] Em uma modalidade, o camundongo é desprovido de segmentos gênicos endógenos de cadeia pesada de imunoglobulina selecionados de dois ou mais segmentos gênicos V, dois ou mais segmentos gênicos D, dois ou mais segmentos gênicos J, e uma combinação destes. Em uma modalidade, o camundongo é desprovido de segmentos do gene da cadeia pesada de imunoglobulina selecionados de pelo menos um e até 89 segmentos gênicos V, pelo menos um e até 13 segmentos gênicos D, pelo menos um e até quatro segmentos gênicos J, e uma combinação destes. Em uma modalidade, o camundongo é desprovido de um fragmento de DNA genômico do cromossomo 2 que compreende cerca de três megabases do locus endógeno da cadeia pesada de imunoglobulina. Em uma modalidade específica, o camundongo é desprovido de todos os segmentos gênicos V, D e J

endógenos funcionais de cadeia pesada. Em uma modalidade específica, o camundongo é desprovido de 89 segmentos gênicos VH, 13 segmentos gênicos DH e quatro segmentos gênicos JH.

[0081] Em um aspecto, é fornecido um camundongo, em que o camundongo possui um genoma na linhagem germinativa que compreende uma modificação de um locus da cadeia pesada de imunoglobulina, em que a modificação do locus da cadeia pesada de imunoglobulina compreende a substituição de uma ou mais sequências da região variável de imunoglobulina de camundongo com uma ou mais sequências da região variável de imunoglobulina que não são de camundongo, e em que o camundongo compreende uma sequência de ácido nucléico que codifica uma proteína ADAM6 de camundongo. Em uma modalidade preferida, as sequências de DH e JH e pelo menos 3, pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 40, pelo menos 60 ou pelo menos 80 sequências de VH do locus da cadeia pesada de imunoglobulina são substituídas por sequências da região variável de imunoglobulina que não são de camundongo. Em uma modalidade preferida adicional, as sequências de DH, de JH e todas as de VH do locus da cadeia pesada de imunoglobulina são substituídas por sequências da região variável de imunoglobulina que não são de camundongo. As sequências da região variável de imunoglobulina que não são de camundongo podem ser não rearranjadas. Em uma modalidade preferida, as sequências da região variável de imunoglobulina que não são de camundongo compreendem regiões DH e JH completas não rearranjadas e pelo menos 3, pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 40, pelo menos 60 ou pelo menos 80 sequências de VH não

rearranjadas da espécie diferente de camundongo. Em uma modalidade preferida adicional, as sequências da região variável de imunoglobulina que não são de camundongo compreendem a região variável completa, incluindo todas as regiões VH, DH e JH da espécie diferente de camundongo. A espécie diferente de camundongo pode ser Homo sapiens e as sequências da região variável de imunoglobulina que não são de camundongo podem ser sequências humanas.

[0082] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que expressa um anticorpo que compreende pelo menos um polipeptídeo de imunoglobulina de domínio variável humano/domínio constante não humano, em que o camundongo expressa uma proteína ADAM6 de camundongo, ou ortólogo ou homólogo desta, por um locus diferente de um locus de imunoglobulina.

[0083] Em uma modalidade, a proteína ADAM6, ou ortólogo ou homólogo desta, é expressa em uma célula B de camundongo, em que a célula B compreende uma sequência de imunoglobulina rearranjada que compreende uma sequência variável humana e uma sequência constante não humana.

[0084] Em uma modalidade, a sequência constante não humana é uma sequência de roedor. Em uma modalidade, o roedor é selecionado de um camundongo, um rato e um hamster.

[0085] Em um aspecto, é fornecido um método para produção de um camundongo-macho infértil, que compreende a restituição de um alelo de ADAM6 endógeno de uma célula ES doadora não funcional (ou knocking out do referido alelo), introdução da célula ES doadora em um embrião hospedeiro, gestação do embrião hospedeiro em uma mãe substituta, e

permissão de que a mãe substituta gere uma prole derivada totalmente ou em parte da célula ES doadora. Em uma modalidade, o método ainda compreende a procriação da prole para obter um camundongo-macho infértil.

[0086] Em um aspecto, é fornecido um método para produção de um camundongo com uma modificação genética de interesse, em que o camundongo é infértil, o método compreendendo as etapas de (a) produção de uma modificação genética de interesse em um genoma; (b) modificação do genoma para fazer o knockout de um alelo de ADAM6 endógeno, ou tornar um alelo de ADAM6 endógeno não funcional; e, (c) emprego do genoma na produção de um camundongo. Em várias modalidades, o genoma é de uma célula ES ou usado em um experimento de transferência nuclear.

[0087] Em um aspecto, é fornecido um camundongo feito usando um vetor de direcionamento, construção de nucleotídeo ou célula como aqui descritos.

[0088] Em um aspecto, é fornecida uma prole de um cruzamento de um camundongo como aqui descrito com um segundo camundongo que é um camundongo do tipo selvagem ou geneticamente modificado.

[0089] Em um aspecto, é fornecido um método para manutenção de uma cepa de camundongo, em que a cepa de camundongo compreende uma substituição de uma sequência da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo com uma ou mais sequências heterólogas da cadeia pesada de imunoglobulina. Em uma modalidade, as (uma ou mais) sequências heterólogas da cadeia pesada de imunoglobulina são sequências da cadeia pesada de imunoglobulina humana.

[0090] Em uma modalidade, a cepa de camundongo

compreende uma deleção de um ou mais segmentos gênicos V_H , D_H e/ou J_H de camundongo. Em uma modalidade, o camundongo ainda compreende um ou mais segmentos gênicos V_H humanos, um ou mais segmentos gênicos D_H humanos e/ou um ou mais segmentos gênicos J_H humanos. Em uma modalidade, o camundongo compreende pelo menos 3, pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 40, pelo menos 60 ou pelo menos 80 segmentos V_H humanos, pelo menos 27 segmentos gênicos D_H humanos e pelo menos seis segmentos gênicos J_H . Em uma modalidade específica, o camundongo compreende pelo menos 3, pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 40, pelo menos 60 ou pelo menos 80 segmentos V_H humanos, os (pelo menos) 27 segmentos gênicos D_H humanos e os (pelo menos) seis segmentos gênicos J_H estão ligados operacionalmente a um gene da região constante. Em uma modalidade, o gene da região constante é um gene da região constante de camundongo. Em uma modalidade, o gene da região constante compreende uma sequência do gene da região constante de camundongo selecionada de uma C_H1 , uma dobradiça, uma C_H2 , uma C_H3 e/ou uma C_H4 , ou uma combinação destas.

[0091] Em uma modalidade, o método compreende a geração de um camundongo-macho heterozigoto para a substituição da sequência da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo, e o cruzamento do camundongo-macho heterozigoto com um camundongo-fêmea do tipo selvagem ou um camundongo-fêmea que é homozigoto ou heterozigoto para a sequência da cadeia pesada humana. Em uma modalidade, o método compreende a manutenção da cepa cruzando-se repetidamente machos heterozigotos com fêmeas que são do tipo selvagem ou homozigotas ou heterozigotas para a sequência da cadeia

pesada humana.

[0092] Em uma modalidade, o método compreende a obtenção de células de camundongos-machos ou camundongos-fêmeas homozigotos ou heterozigotos para a sequência da cadeia pesada humana, e o emprego daquelas células como células doadoras ou seus núcleos como núcleos doadores, e utilização das células ou núcleos par a produção de animais geneticamente modificados usando células hospedeiras e/ou gestação das células e/ou núcleos em mães substitutas.

[0093] Em uma modalidade, somente camundongos-machos que são heterozigotos para a substituição no locus da cadeia pesada são cruzados com camundongos-fêmeas. Em uma modalidade específica, os camundongos-fêmeas são homozigotos, heterozigotos, ou do tipo selvagem com relação a um locus da cadeia pesada substituído.

[0094] Em uma modalidade, o camundongo ainda compreende uma substituição de sequências variáveis de cadeia leve λ e/ou κ em um locus endógeno da cadeia leve de imunoglobulina com sequências heterólogas da cadeia leve de imunoglobulina. Em uma modalidade, as sequências heterólogas da cadeia leve de imunoglobulina são sequências variáveis de cadeia leve λ e/ou κ de imunoglobulina humana.

[0095] Em uma modalidade, o camundongo ainda compreende um transgene em um locus diferente de um locus endógeno de imunoglobulina, em que o transgene compreende uma sequência que codifica uma sequência heteróloga da cadeia leve λ ou κ rearranjada ou não rearranjada (por exemplo, V_L não rearranjada e J_L não rearranjada, ou VJ rearranjada) ligada operacionalmente (para não rearranjada) ou fundida (para rearranjada) a uma sequência da região constante da cadeia

leve de imunoglobulina. Em uma modalidade, a sequência heteróloga da cadeia leve λ ou κ é humana. Em uma modalidade, a sequência da região constante é selecionada de roedor, humano e primata não humana. Em uma modalidade, a sequência da região constante é selecionada de camundongo, rato e hamster. Em uma modalidade, o transgene compreende um promotor não imunoglobulina que dirige a expressão das sequências da cadeia leve. Em uma modalidade específica, o promotor é um promotor transcricionalmente ativo. Em uma modalidade específica, o promotor é um promotor de ROSA26.

[0096] Em um aspecto, é fornecida uma construção de ácido nucléico que compreende um braço de homologia acima e um braço de homologia abaixo, em que o braço de homologia acima compreende uma sequência que é idêntica ou substancialmente idêntica a uma sequência da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina humana, o braço de homologia abaixo compreende uma sequência que é idêntica ou substancialmente idêntica a uma sequência da região variável de imunoglobulina humana ou de camundongo, e disposta entre os braços de homologia acima e abaixo e é uma sequência que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína ADAM6 de camundongo. Em uma modalidade específica, a sequência que codifica o gene de ADAM6 de camundongo está ligada operacionalmente a um promotor de camundongo com o qual a ADAM6 de camundongo está ligada em um camundongo do tipo selvagem.

[0097] Em um aspecto, é fornecido um vetor de direcionamento que compreende: (a) uma sequência de nucleotídeos que é idêntica ou substancialmente idêntica a

uma sequência de nucleotídeos de segmento do gene da região variável humana; e, (b) uma sequência de nucleotídeos que codifica uma ADAM6 de camundongo, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento desta, que é funcional em um camundongo.

[0098] Em uma modalidade, o vetor de direcionamento ainda compreende um promotor ligado operacionalmente à sequência que codifica a ADAM6 de camundongo. Em uma modalidade específica, o promotor é um promotor de ADAM6 de camundongo.

[0099] Em um aspecto, é fornecida uma construção de nucleotídeo para modificação de um locus variável da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo, em que a construção compreende pelo menos um sítio de reconhecimento de recombinase sítio-específico e uma sequência que codifica uma proteína ADAM6, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento desta, que é funcional em um camundongo.

[00100] Em um aspecto, são fornecidas células de camundongo e embriões de camundongo, incluindo, sem limitação, células ES, células pluripotentes e células pluripotentes induzidas, que compreendem modificações genéticas como aqui descritas. São fornecidas células que são XX e células que são XY. Células que compreendem um núcleo que contém uma modificação como aqui descrita também são fornecidas, por exemplo, uma modificação introduzida em uma célula por injeção pró-nuclear. Células, embriões e camundongos que compreendem um gene de ADAM6 introduzido por meio viral também são fornecidos, por exemplo, células, embriões e camundongos que compreendem a construção de transdução que compreende um gene de ADAM6 que é funcional no camundongo.

[00101] Em um aspecto, é fornecida uma célula de camundongo geneticamente modificada, em que a célula é desprovida de um locus endógeno funcional de ADAM6 de camundongo, e a célula compreende uma sequência de nucleotídeos ectópica que codifica uma proteína ADAM6 de camundongo ou fragmento funcional desta. Em uma modalidade, a célula ainda compreende uma modificação de uma sequência gênica variável da cadeia pesada de imunoglobulina endógena. Em uma modalidade específica, a modificação da sequência gênica variável da cadeia pesada de imunoglobulina endógena compreende uma deleção selecionada de uma deleção de um segmento gênico VH de camundongo, uma deleção de um segmento gênico DH de camundongo, uma deleção de um segmento gênico JH de camundongo, e uma combinação destes. Em uma modalidade específica, o camundongo compreende uma substituição de uma ou mais sequências de VH, DH e/ou JH de imunoglobulina de camundongo com uma sequência de imunoglobulina humana. Em uma modalidade específica, a sequência de imunoglobulina humana é selecionada de uma VH humana, uma VL humana, uma DH humana, uma JH humana, uma JL humana, e uma combinação destas.

[00102] Em uma modalidade, a célula é uma célula totipotente, uma célula pluripotente ou uma célula pluripotente induzida. Em uma modalidade específica, a célula é uma célula de camundongo ES.

[00103] Em um aspecto, é fornecida uma célula B de camundongo, em que a célula B de camundongo compreende um gene rearranjado da cadeia pesada de imunoglobulina, em que a célula B compreende em um cromossomo da célula B uma sequência de ácido nucléico que codifica uma proteína

ADAM6, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento desta, que é funcional em um camundongo-macho. Em uma modalidade, a célula B de camundongo compreende dois alelos da sequência de ácido nucléico.

[00104] Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico está em um molécula de ácido nucléico (por exemplo, um cromossomo de célula B) que é contígua com o locus rearranjado de cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo.

[00105] Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico está em um molécula de ácido nucléico (por exemplo, um cromossomo de célula B) que é distinta da molécula de ácido nucléico que compreende o locus rearranjado de cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo.

[00106] Em uma modalidade, a célula B de camundongo compreende uma sequência gênica variável de imunoglobulina não camundongo rearranjada ligada operacionalmente a um gene da região constante de imunoglobulina de camundongo ou humana, em que a célula B compreende uma sequência de ácido nucléico que codifica uma proteína ADAM6, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento desta, que é funcional em um camundongo-macho.

[00107] Em um aspecto, é fornecida uma célula somática de camundongo que compreende um cromossomo que compreende um locus da cadeia pesada de imunoglobulina modificado, e uma sequência de ácido nucléico que codifica uma ADAM6 de camundongo, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento desta, que é funcional em um camundongo-macho. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico está no mesmo cromossomo que o

lócus da cadeia pesada de imunoglobulina modificado. Em uma modalidade, o ácido nucléico está em um cromossomo diferente do que o lócus da cadeia pesada de imunoglobulina modificado. Em uma modalidade, a célula somática compreende uma única cópia da sequência de ácido nucléico. Em uma modalidade, a célula somática compreende pelo menos duas cópias da sequência de ácido nucléico. Em uma modalidade específica, a célula somática é uma célula B. Em uma modalidade específica, a célula é uma célula germinativa. Em uma modalidade específica, a célula é uma célula-tronco.

[00108] Em um aspecto, é fornecida uma célula germinativa de camundongo que compreende uma sequência de ácido nucléico que codifica uma ADAM6 de camundongo (ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional desta) em um cromossomo da célula germinativa, em que a sequência de ácido nucléico que codifica a ADAM6 de camundongo (ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional desta) está em uma posição no cromossomo que é diferente de uma posição em um cromossomo de uma célula germinativa de camundongo do tipo selvagem. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico está em um lócus de imunoglobulina de camundongo. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico está no mesmo cromossomo da célula germinativa que um lócus de imunoglobulina de camundongo. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico está em um cromossomo diferente da célula germinativa do que o lócus de imunoglobulina de camundongo. Em uma modalidade, o lócus de imunoglobulina de camundongo compreende uma substituição de pelo menos uma sequência de imunoglobulina de camundongo com pelo menos uma sequência de imunoglobulina não camundongo. Em uma

modalidade específica, a (pelo menos) uma sequência de imunoglobulina não camundongo é uma sequência de imunoglobulina humana.

[00109] Em um aspecto, é fornecida uma célula pluripotente, pluripotente induzida ou totipotente derivada de um camundongo, como aqui descritas. Em uma modalidade específica, a célula é um camundongo célula-tronco (ES) embrionária.

[00110] Em um aspecto, é fornecido um tecido derivado de um camundongo como aqui descrito. Em uma modalidade, o tecido é derivado do baço, linfonodo ou medula óssea de um camundongo como aqui descrito.

[00111] Em um aspecto, é fornecido um núcleo derivado de um camundongo como aqui descrito. Em uma modalidade, o núcleo é de uma célula diplóide que não é uma célula B.

[00112] Em um aspecto, é fornecida uma sequência de nucleotídeos que codifica uma região variável de imunoglobulina feita em um camundongo como aqui descrito.

[00113] Em um aspecto, é fornecida uma sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve de imunoglobulina ou da cadeia pesada de imunoglobulina de um anticorpo feita em um camundongo como aqui descrito.

[00114] Em um aspecto, é fornecida uma sequência de nucleotídeos da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina ou da cadeia leve de imunoglobulina que codifica uma região variável de um anticorpo feita em um camundongo como aqui descrito.

[00115] Em um aspecto, é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno deste (por exemplo, Fab, F(ab)2, scFv) feito em um camundongo como aqui descrito. Em

um aspecto, é fornecido um método para produção de um camundongo geneticamente modificado que compreende a substituição de um ou mais segmentos do gene da cadeia pesada de imunoglobulina acima (com relação à transcrição dos segmentos do gene da cadeia pesada de imunoglobulina) de um locus de ADAM6 endógeno do camundongo com um ou mais segmentos do gene da cadeia pesada de imunoglobulina humana, e substituição de um ou mais segmentos do gene de imunoglobulina abaixo (com relação à transcrição dos segmentos do gene da cadeia pesada de imunoglobulina) do locus de ADAM6 do camundongo com um ou mais segmentos do gene da cadeia pesada ou da cadeia leve de imunoglobulina humana. Em uma modalidade, os (um ou mais) segmentos do gene de imunoglobulina humana que substituem um ou mais segmentos do gene endógeno de imunoglobulina acima de um locus de ADAM6 endógeno do camundongo incluem segmentos gênicos V. Em uma modalidade, os segmentos do gene de imunoglobulina humana que substituem um ou mais segmentos do gene endógeno de imunoglobulina acima de um locus de ADAM6 endógeno do camundongo incluem segmentos gênicos V e D. Em uma modalidade, os (um ou mais) segmentos do gene de imunoglobulina humana que substituem um ou mais segmentos do gene endógeno de imunoglobulina abaixo de um locus de ADAM6 endógeno do camundongo incluem segmentos gênicos J. Em uma modalidade, os (um ou mais) segmentos do gene de imunoglobulina humana que substituem um ou mais segmentos do gene endógeno de imunoglobulina abaixo de um locus de ADAM6 endógeno do camundongo incluem segmentos gênicos D e J. Em uma modalidade, os (um ou mais) segmentos do gene de imunoglobulina humana que substituem um ou mais segmentos

do gene endógeno de imunoglobulina abaixo de um locus de ADAM6 endógeno do camundongo incluem segmentos gênicos V, D e J.

[00116] Em uma modalidade, os (um ou mais) segmentos do gene da cadeia pesada de imunoglobulina acima e/ou abaixo do gene de ADAM6 são substituídos em uma célula pluripotente, pluripotente induzida ou totipotente para formar uma célula progenitora geneticamente modificada; a célula progenitora geneticamente modificada é introduzida em um hospedeiro; e o hospedeiro que compreende a célula progenitora geneticamente modificada é gerado para formar um camundongo que compreende um genoma derivado da célula progenitora geneticamente modificada. Em uma modalidade, o hospedeiro é um embrião. Em uma modalidade específica, o hospedeiro é selecionado de uma pré-mórula de camundongo (por exemplo, estágio de 8 ou 4 células), um embrião tetraplóide, um agregado de células embrionárias ou um blastocisto.

[00117] Em um aspecto, é fornecido um método para produção de um camundongo geneticamente modificado que compreende a substituição de uma sequência de nucleotídeos de camundongo que compreende um segmento do gene de imunoglobulina de camundongo e uma sequência de nucleotídeos de ADAM6 de camundongo (ou ortólogo ou homólogo ou fragmento desta funcional em um camundongo-macho) com uma sequência que compreende um segmento do gene de imunoglobulina humana para formar um primeiro locus quimérico, e depois inserção de uma sequência que compreende uma sequência que codifica ADAM6 de camundongo (ou uma sequência que codifica um ortólogo ou homólogo ou

fragmento funcional desta) na sequência que compreende o segmento do gene de imunoglobulina humana para formar um segundo locus quimérico.

[00118] Em uma modalidade, o segundo locus quimérico compreende um segmento gênico variável da cadeia pesada (VH) de imunoglobulina humana. Em uma modalidade, o segundo locus quimérico compreende um segmento gênico variável da cadeia leve (VL) de imunoglobulina humana. Em uma modalidade específica, o segundo locus quimérico compreende um segmento gênico VH humano ou um segmento gênico VL humano ligado operacionalmente a um segmento gênico DH humano e um segmento gênico JH humano. Em uma modalidade específica adicional, o segundo locus quimérico está ligado operacionalmente a um terceiro locus quimérico que compreende uma sequência de CH1 humana, ou a sequência de CH1 humana e de dobradiça humana, fundida com uma sequência de CH2 + CH3 de camundongo.

[00119] Em um aspecto, é fornecido o uso de um camundongo que compreende uma sequência de nucleotídeos ectópica que compreende um locus ou sequência de ADAM6 de camundongo para produzir um camundongo-macho fértil, em que o uso compreende cruzamento do camundongo que compreende a sequência de nucleotídeos ectópica que compreende o locus ou sequência de ADAM6 de camundongo com um camundongo desprovido de um locus ou sequência endógena funcional de ADAM6 de camundongo, e obtenção de uma prole que é uma fêmea capaz de produzir uma prole que possui o locus ou a sequência de ADAM6 ectópica ou que é um macho que compreende o locus ou a sequência de ADAM6 ectópica, e o macho exibe uma fertilidade que é aproximadamente igual a

uma fertilidade exibida por um camundongo-macho do tipo selvagem.

[00120] Em um aspecto, é fornecido o uso de um camundongo como aqui descrito para produzir uma sequência de nucleotídeos da região variável de imunoglobulina.

[00121] Em um aspecto, é fornecido o uso de um camundongo como aqui descrito para produzir um Fab completamente humano ou um F(ab)2 completamente humano.

[00122] Em um aspecto, é fornecido o uso de um camundongo como aqui descrito para produzir uma linhagem de células imortalizadas.

[00123] Em um aspecto, é fornecido o uso de um camundongo como aqui descrito para produzir um hibridoma ou quadroma.

[00124] Em um aspecto, é fornecido o uso de um camundongo como aqui descrito para produzir uma biblioteca de fago contendo regiões variáveis da cadeia pesada humana e regiões variáveis da cadeia leve humana.

[00125] Em um aspecto, é fornecido o uso de um camundongo como aqui descrito para gerar uma sequência da região variável para produção de um anticorpo humano que compreende (a) a imunização de um camundongo como aqui descrito com um antígeno de interesse, (b) isolamento de um linfócito do camundongo imunizado de (a), (c) exposição do linfócito a um ou mais anticorpos marcados, (d) identificação de um linfócito que é capaz de se ligar ao antígeno de interesse, e (e) amplificação de uma ou mais sequências de ácidos nucleicos da região variável do linfócito gerando, dessa forma, uma sequência da região variável.

[00126] Em uma modalidade, o linfócito é derivado do baço do camundongo. Em uma modalidade, o linfócito é derivado de um linfonodo do camundongo. Em uma modalidade, o linfócito é derivado da medula óssea do camundongo.

[00127] Em uma modalidade, o anticorpo marcado é um anticorpo conjugado a um fluoróforo. Em uma modalidade, os (um ou mais) anticorpos conjugados a um fluoróforo são selecionados de uma IgM, uma IgG e/ou uma combinação destas.

[00128] Em uma modalidade, o linfócito é uma célula B.

[00129] Em uma modalidade, as (uma ou mais) sequências de ácidos nucleicos da região variável compreendem uma sequência da cadeia pesada da região variável. Em uma modalidade, as (uma ou mais) sequências de ácidos nucleicos da região variável compreendem uma sequência da região variável da cadeia leve. Em uma modalidade específica, a sequência da região variável da cadeia leve é uma sequência da região variável da cadeia leve κ de imunoglobulina. Em uma modalidade, as (uma ou mais) sequências de ácidos nucleicos da região variável compreendem uma sequência da região variável da cadeia pesada e uma da cadeia leve κ .

[00130] Em uma modalidade, é fornecido o uso de um camundongo como aqui descrito para gerar uma sequência da região variável da cadeia pesada e uma da cadeia leve κ para produção de um anticorpo humano que compreende: (a) a imunização de um camundongo como aqui descrito com um antígeno de interesse, (b) isolamento do baço do camundongo imunizado de (a), (c) exposição dos linfócitos B do baço a um ou mais anticorpos marcados, (d) identificação de um linfócito B de (c) que é capaz de se ligar ao antígeno de

interesse, e (e) amplificação de uma sequência de ácido nucléico da cadeia pesada da região variável e uma sequência de ácido nucléico da região variável da cadeia leve κ do linfócito B gerando, dessa forma as sequências da região variável da cadeia pesada e da cadeia leve κ .

[00131] Em uma modalidade, é fornecido o uso de um camundongo como aqui descrito para gerar uma sequência da região variável da cadeia pesada e uma da cadeia leve κ para produção de um anticorpo humano que compreende: (a) a imunização de um camundongo como aqui descrito com um antígeno de interesse, (b) isolamento de um ou mais linfonodos do camundongo imunizado de (a), (c) exposição dos linfócitos B dos (um ou mais) linfonodos a um ou mais anticorpos marcados, (d) identificação de um linfócito B de (c) que é capaz de se ligar ao antígeno de interesse, e (e) amplificação de uma sequência de ácido nucléico da cadeia pesada da região variável e uma sequência de ácido nucléico da região variável da cadeia leve κ do linfócito B gerando, dessa forma as sequências da região variável da cadeia pesada e da cadeia leve κ .

[00132] Em uma modalidade, é fornecido o uso de um camundongo como aqui descrito para gerar uma sequência da região variável da cadeia pesada e uma da cadeia leve κ para produção de um anticorpo humano que compreende: (a) a imunização de um camundongo como aqui descrito com um antígeno de interesse, (b) isolamento da medula óssea do camundongo imunizado de (a), (c) exposição dos linfócitos B da medula óssea a um ou mais anticorpos marcados, (d) identificação de um linfócito B de (c) que é capaz de se ligar ao antígeno de interesse, e (e) amplificação de uma

sequência de ácido nucléico da cadeia pesada da região variável e uma sequência de ácido nucléico da região variável da cadeia leve κ do linfócito B gerando, dessa forma as sequências da região variável da cadeia pesada e da cadeia leve κ . Em várias modalidades, os (um ou mais) anticorpos marcados são selecionados de uma IgM, uma IgG e/ou uma combinação destas.

[00133] Em várias modalidades, é fornecido o uso de um camundongo como aqui descrito para gerar uma sequência da região variável da cadeia pesada e leve κ para produção de um anticorpo humano que compreende ainda a fusão das sequências amplificadas da região variável da cadeia pesada e leve às sequências da região constante das cadeias pesada e leve humanas, expressão das sequências das cadeias pesada e leve fundidas em uma célula, e recuperação das sequências das cadeias pesada e leve expressas gerando, dessa forma, um anticorpo humano.

[00134] Em várias modalidades, as regiões constantes da cadeia pesada humana são selecionadas de IgM, IgD, IgA, IgE e IgG. Em várias modalidades específicas, a IgG é selecionada de uma IgG1, uma IgG2, uma IgG3 e uma IgG4. Em várias modalidades, a região constante da cadeia pesada humana compreende uma CH1, uma dobradiça, uma CH2, uma CH3, uma CH4, ou uma combinação destas. Em várias modalidades, a região constante da cadeia leve é uma região constante κ de imunoglobulina. Em várias modalidades, a célula é selecionada de uma célula HeLa, uma célula DU145, uma célula Lncap, uma célula MCF-7, uma célula MDA-MB-438, uma célula PC3, uma célula T47D, uma célula THP-1, uma célula U87, uma célula SHSY5Y (neuroblastoma humano), uma célula

Saos-2, uma célula Vero, uma célula CHO, uma célula GH3, uma célula PC12, uma célula retiniana humana (por exemplo, uma célula PER.C6™), e uma célula MC3T3. Em uma modalidade específica, a célula é uma célula CHO.

[00135] Em um aspecto, é fornecido um método para geração de um anticorpo específico reverso-quimérico de roedor-humano contra um antígeno de interesse que compreende as etapas de imunização de um camundongo como aqui descrito com o antígeno, isolamento de pelo menos uma célula do camundongo que produz um anticorpo reverso-quimérico de camundongo-humano específico contra o antígeno, cultivo de pelo menos uma célula que produz o anticorpo reverso-quimérico de camundongo-humano específico contra o antígeno, e obtenção do referido anticorpo.

[00136] Em uma modalidade, o anticorpo reverso-quimérico de camundongo-humano compreende um domínio variável da cadeia pesada humana fundido com um gene constante da cadeia pesada de camundongo ou rato, e um domínio variável da cadeia leve humana fundido com um gene constante da cadeia leve de camundongo ou de rato ou humana.

[00137] Em uma modalidade, o cultivo de pelo menos uma célula que produz o anticorpo específico reverso-quimérico de roedor-humano contra o antígeno é realizado em pelo menos uma célula de hibridoma gerada pela (pelo menos uma) célula isolada do camundongo.

[00138] Em um aspecto, é fornecido um método para geração de um anticorpo totalmente humano específico contra um antígeno de interesse que compreende as etapas de imunização de um camundongo como aqui descrito com o

antígeno, isolamento de pelo menos uma célula do camundongo que produz um anticorpo específico reverso-quimérico de roedor-humano contra o antígeno, a geração de pelo menos uma célula que produz um anticorpo totalmente humano derivado do anticorpo específico reverso-quimérico de roedor-humano contra o antígeno, e cultivo de pelo menos uma célula que produz o anticorpo totalmente humano e obtenção do referido anticorpo totalmente humano.

[00139] Em várias modalidades, a (pelo menos uma) célula isolada do camundongo que produz um anticorpo específico reverso-quimérico de roedor-humano contra o antígeno é um esplenócito ou uma célula B.

[00140] Em várias modalidades, o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

[00141] Em várias modalidades, a imunização com o antígeno de interesse é realizada com proteína, DNA, uma combinação de DNA e proteína ou células que expressam o antígeno.

[00142] Em um aspecto, é fornecido uso de um camundongo como aqui descrito para produzir uma sequência de ácido nucléico que codifica uma região variável de imunoglobulina ou fragmento desta. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico é usada para produzir um anticorpo humano ou fragmento de ligação de antígeno deste. Em uma modalidade, o camundongo é usado para produzir uma proteína de ligação de antígeno selecionada de um anticorpo, um anticorpo multiespecífico (por exemplo, um anticorpo biespecífico), um scFv, um scFv biespecífico, um diabody, um triabody, um tetrabody, um V-NAR, um VHH, em VL, um F(ab), um F(ab)₂, um DVD (ou seja, proteína de ligação de antígeno de domínio

variável duplo), a um SVD (ou seja, proteína de ligação de antígeno de domínio variável simples), ou a célula T biespecífica engager (BiTE).

[00143] Em um aspecto, é fornecido o uso de um camundongo como aqui descrito para introduzir uma sequência de ADAM6 ectópica em um camundongo desprovido de uma sequência de ADAM6 funcional endógena de camundongo, em que o uso compreende o cruzamento de um camundongo como aqui descrito com o camundongo desprovido da sequência de ADAM6 funcional endógena de camundongo.

[00144] Em um aspecto, é fornecido o uso de material genético de um camundongo como aqui descrito para produzir um camundongo que possui uma sequência de ADAM6 ectópica. Em uma modalidade, o uso compreende a transferência nuclear usando um núcleo de uma célula de um camundongo como aqui descrito. Em uma modalidade, o uso compreende a clonagem de uma célula de um camundongo como aqui descrito para produzir um animal derivado da célula. Em uma modalidade, o uso compreende o emprego de um espermatozoide ou um óvulo de um camundongo como aqui descrito em um processo para produção de um camundongo que compreende a sequência de ADAM6 ectópica.

[00145] Em um aspecto, é fornecido um método para produção de um camundongo-macho fértil que compreende um locus da cadeia pesada de imunoglobulina modificado, que compreende a fertilização de uma primeira célula germinativa de camundongo que compreende uma modificação de um locus endógeno da cadeia pesada de imunoglobulina com uma segunda célula germinativa de camundongo que compreende um gene de ADAM6, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento

deste, que é funcional em um camundongo-macho; formação de uma célula fertilizada; permissão que a célula fertilizada se desenvolva em um embrião; e, gestação do embrião em um substituto para obter um camundongo.

[00146] Em uma modalidade, a fertilização é obtida por cruzamento de um camundongo-macho e um camundongo-fêmea. Em uma modalidade, o camundongo-fêmea compreende o gene de ADAM6 ou ortólogo ou homólogo ou fragmento deste. Em uma modalidade, o camundongo-macho compreende o gene de ADAM6 ou ortólogo ou homólogo ou fragmento deste.

[00147] Em um aspecto, é fornecido o uso de uma sequência de ácido nucléico que codifica uma proteína ADAM6 de camundongo ou um ortólogo ou homólogo desta ou um fragmento funcional da proteína ADAM6 correspondente para restauração ou aumento da fertilidade de um camundongo que possui um genoma que compreende uma modificação de um locus da cadeia pesada de imunoglobulina, em que a modificação reduz ou elimina a função endógena de ADAM6.

[00148] Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico é integrada no genoma do camundongo em uma posição ectópica. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico é integrada no genoma do camundongo em um locus endógeno de imunoglobulina. Em uma modalidade específica, o locus endógeno de imunoglobulina é um locus da cadeia pesada. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico é integrada no genoma do camundongo em uma posição diferente de um locus endógeno de imunoglobulina.

[00149] Em um aspecto, é fornecido uso do camundongo como aqui descrito para a fabricação de um medicamento (por exemplo, uma proteína de ligação de antígeno), ou para a

fabricação de uma sequência que codifica uma sequência variável de um medicamento (por exemplo, uma proteína de ligação de antígeno), para o tratamento de uma doença ou distúrbio humano.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00150] A **FIG. 1A** mostra uma ilustração geral, não em escala, da substituição genômica direta de cerca de três megabases (Mb) de um locus do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo (símbolos fechados) com cerca de uma megabase (Mb) do locus do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina humana (símbolos abertos).

[00151] A **FIG. 1B** mostra uma ilustração geral, não em escala, da substituição genômica direta de cerca de três megabases (Mb) de um locus do gene variável da cadeia leve κ de imunoglobulina de camundongo (símbolos fechados) com cerca de 0,5 megabase (Mb) das primeiras repetições, ou das repetições proximais, de duas repetições quase idênticas de um locus do gene variável da cadeia leve κ de imunoglobulina humana (símbolos abertos).

[00152] A **FIG. 2A** mostra uma ilustração detalhada, não em escala, de três etapas iniciais (A-C) para substituição genômica direta de um locus do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo que resulta na deleção de todos os segmentos gênicos V_H , D_H e J_H de camundongo e substituição com três V_H humanas, todos os segmentos gênicos D_H e J_H humanos. Um vetor de direcionamento para uma primeira inserção de segmentos do gene da cadeia pesada de imunoglobulina humana é mostrado (3h V_H BACvec) com um braço de homologia de camundongo 5' de 67 kb, um cassete de seleção (retângulo aberto), um sítio

de recombinação sítio-específico (triângulo aberto), um fragmento genômico humano de 145 kb e um braço de homologia de camundongo 3' de 8 kb. Segmentos do gene de imunoglobulina humana (símbolos abertos) e de camundongo (símbolos fechados), cassetes de seleção adicionais (retângulos abertos) e sítios de recombinação sítio-específicos (triângulos abertos) inseridos de vetores de direcionamento subsequentes são mostrados.

[00153] A FIG. 2B mostra uma ilustração detalhada, não em escala, de seis etapas adicionais (D-I) para substituição genômica direta de um locus do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo que resulta na inserção de 77 segmentos gênicos V_H humanos adicionais e remoção de um cassete de seleção final. Um vetor de direcionamento para inserção de segmentos gênicos V_H humanos adicionais (18h V_H BACvec) à inserção inicial de segmentos do gene da cadeia pesada humana (Alelo híbrido 3h V_H -CRE) é mostrado com um braço de homologia de camundongo 5' de 20 kb, um cassete de seleção (retângulo aberto), um fragmento genômico humano de 196 kb e um braço de homologia humano de 62 kb que se superpõe com a extremidade 5' da inserção inicial de segmentos do gene da cadeia pesada humana que é mostrado com um sítio de recombinação sítio-específico (triângulo aberto) localizado 5' aos segmentos gênicos humanos. Segmentos do gene de imunoglobulina humana (símbolos abertos) e de camundongo (símbolos fechados) e cassetes de seleção adicionais (retângulos abertos) inseridos por vetores de direcionamento subsequentes são mostrados.

[00154] A FIG. 2C mostra uma ilustração detalhada, não

em escala, de três etapas iniciais (A-C) para substituição genômica direta de um locus do gene variável da cadeia leve κ de imunoglobulina de camundongo que resulta na deleção de todos os segmentos gênicos V_{κ} e J_{κ} de camundongo (Alelo híbrido Ig κ -CRE). Cassetes de seleção (retângulos abertos) e sítios de recombinação sítio-específicos (triângulos abertos) inseridos pelos vetores de direcionamento são mostrados.

[00155] A FIG. 2D mostra uma ilustração detalhada, não em escala, de cinco etapas adicionais (D-H) para substituição genômica direta de um locus do gene variável da cadeia leve κ de imunoglobulina de camundongo que resulta na inserção de todos os segmentos gênicos V_{κ} e J_{κ} humanos da repetição proximal e deleção de um cassete de seleção final (Alelo híbrido de 40hVkdHyg). Segmentos do gene de imunoglobulina humana (símbolos abertos) e de camundongo (símbolos fechados) e cassetes de seleção adicionais (retângulos abertos) inseridos por vetores de direcionamento subsequentes são mostrados.

[00156] A FIG. 3A mostra uma ilustração geral, não em escala, de uma estratégia de triagem que inclui as localizações de conjuntos de iniciador/sonda de PCR quantitativa (qPCR) para detectar a inserção de sequências do gene da cadeia pesada humana e perda de sequências do gene da cadeia pesada de camundongo em células-tronco embrionárias (ES) direcionadas. A estratégia de triagem em células ES e camundongos para uma primeira inserção do gene da cadeia pesada humana é mostrada com conjuntos de iniciador/sonda de qPCR para a região deletada (sondas de "perda" C e D), para a região inserida (sondas "hIgH" G e

H) e regiões de flaqueamento (sondas de "retenção" A, B, E e F) em um cromossomo de camundongo não modificado (superior) e um cromossomo corretamente direcionado (inferior).

[00157] A **FIG. 3B** mostra um cálculo representativo do número de cópia de sonda observado em células ES progenitoras e modificadas para uma primeira inserção de segmentos do gene da cadeia pesada de imunoglobulina humana. Os números de cópia de sonda observado para as sondas A a F foram calculados como $2/2^{\Delta\Delta Ct}$. $\Delta\Delta Ct$ é calculado como $\text{ave}[\Delta Ct \text{ (amostra)} - \text{med}\Delta Ct \text{ (controle)}]$, em que ΔCt é a diferença em Ct entre sondas de teste e de referência (entre 4 e 6 sondas de referência, dependendo do ensaio). O termo $\text{med}\Delta Ct \text{ (controle)}$ é o ΔCt mediano de múltiplas (>60) amostras de DNA não direcionado de células ES progenitoras. Cada clone de célula ES modificada foi testado seis vezes. Para calcular números de cópia de sondas IgH G e H em células ES progenitoras, foi presumido que essas sondas possuem um número de cópia de 1 em células ES modificadas, e um Ct máximo de 35 foi usado, embora nenhuma amplificação fosse observada.

[00158] A **FIG. 3C** mostra um cálculo representativo de números de cópia para quatro camundongos de cada genótipo calculados usando somente sondas D e H. camundongos do tipo selvagem: Camundongos WT; Camundongos heterozigoto para uma primeira inserção de segmentos do gene de imunoglobulina humana: Camundongos HET; Camundongos homozigoto para uma primeira inserção de segmentos do gene de imunoglobulina humana: Camundongos Homo.

[00159] A **FIG. 4A** mostra uma ilustração detalhada, não

em escala, das três etapas empregadas para construção de um 3hV_H BACvec por recombinação homóloga bacteriana (BHR). Segmentos do gene de imunoglobulina humana (símbolos abertos) e de camundongo (símbolos fechados), cassetes de seleção (retângulos abertos) e sítios de recombinação sítio-específicos (triângulos abertos) inseridos por vetores de direcionamento são mostrados.

[00160] A **FIG. 4B** mostra eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE) de três clones de BAC (B1, B2 e B3) após digestão com NotI. Os marcadores M1, M2 e M3 são marcadores de PFG de amplitude baixa, de amplitude média e *ladder* lambda, respectivamente (New Inglaterra BioLabs, Ipswich, MA).

[00161] A **FIG. 5A** mostra uma ilustração esquemática, não em escala, de modificações sequenciais de um locus da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo com quantidades crescentes de segmentos do gene da cadeia pesada de imunoglobulina humana. Camundongos homozigotos foram feitos de cada um dos três estágios diferentes de humanização da cadeia pesada. Símbolos abertos indicam sequência humana; símbolos fechados indicam sequência de camundongo.

[00162] A **FIG. 5B** mostra uma ilustração esquemática, não em escala, de modificações sequenciais de um locus da cadeia leve κ de imunoglobulina de camundongo com quantidades crescentes de segmentos do gene da cadeia leve κ de imunoglobulina humana. Camundongos homozigotos foram feitos de cada um dos três estágios diferentes de humanização da cadeia leve κ . Símbolos abertos indicam sequência humana; símbolos fechados indicam sequência de

camundongo.

[00163] A **FIG. 6** mostra FACS matrizes de pontos de populações de células B in camundongos do tipo selvagem e humanizados VELOCIMMUNE®. Células do baço (fileira de cima, terceira fileira a partir do topo e fileira inferior) ou linfonodo inguinal (segunda fileira a partir do topo) de camundongos do tipo selvagem (wt), VELOCIMMUNE® 1 (V1), VELOCIMMUNE® 2 (V2) ou VELOCIMMUNE® 3 (V3) foram coradas for células B que expressam IgM de superfície (fileira de cima e segunda fileira a partir do topo), imunoglobulina de superfície contendo cadeias leves κ ou λ (terceira fileira a partir do topo) ou IgM de superfície de haplótipos específicos (fileira inferior), e populações separadas por FACS.

[00164] A **FIG. 7A** mostra sequências representativas de CDR3 da cadeia pesada de anticorpos VELOCIMMUNE® selecionados aleatoriamente em torno da junção V_H - D_H - J_H (CDR3), demonstrando a diversidade juncional e adições de nucleotídeos. As sequências de CDR3 da cadeia pesada são agrupadas de acordo com o uso do segmento gênico D_H , cuja linhagem germinativa é fornecida acima de cada grupo em negrito. Os segmentos gênicos V_H para cada sequência de CDR3 da cadeia pesada estão anotados entre parênteses na extremidade 5' de cada sequência (por exemplo, 3-72 é V_H 3-72 humana). Os segmentos gênicos J_H para cada cadeia pesada CDR3 estão anotados entre parênteses na extremidade 3' de cada sequência (por exemplo, 3 é J_H 3 humana). Os N^{os} DOS IDS. DE SEQ. para cada sequência são os seguintes, de cima para baixo: ID. DE SEQ. N^o: 21; ID. DE SEQ. N^o: 22; ID. DE SEQ. N^o: 23; ID. DE SEQ. N^o: 24; ID. DE SEQ. N^o: 25; ID. DE

SEQ. N°: 26; ID. DE SEQ. N°: 27; ID. DE SEQ. N°: 28; ID. DE SEQ. N°: 29; ID. DE SEQ. N°: 30; ID. DE SEQ. N°: 31; ID. DE SEQ. N°: 32; ID. DE SEQ. N°: 33; ID. DE SEQ. N°: 34; ID. DE SEQ. N°: 35; ID. DE SEQ. N°: 36; ID. DE SEQ. N°: 37; ID. DE SEQ. N°: 38; ID. DE SEQ. N°: 39.

[00165] A **FIG. 7B** mostra sequências de CDR3 da cadeia leve representativas de anticorpos VELOCIMMUNE® selecionados aleatoriamente em torno da junção V_k - J_k (CDR3), demonstrando diversidade juncional e adições de nucleotídeos. Os segmentos gênicos V_k para cada sequência de CDR3 da cadeia leve estão anotados entre parênteses na extremidade 5' de cada sequência (por exemplo, 1-6 é V_{k1} -6 humana). Os segmentos gênicos J_k para CDR3 da cada cadeia leve estão anotados entre parênteses na extremidade 3' de cada sequência (por exemplo, 1 é J_{k1} humana). Os N°s DOS IDS. DE SEQ. para cada sequência são os seguintes, de cima para baixo: ID. DE SEQ. N°: 40; ID. DE SEQ. N°: 41; ID. DE SEQ. N°: 42; ID. DE SEQ. N°: 43; ID. DE SEQ. N°: 44; ID. DE SEQ. N°: 45; ID. DE SEQ. N°: 46; ID. DE SEQ. N°: 47; ID. DE SEQ. N°: 48; ID. DE SEQ. N°: 49; ID. DE SEQ. N°: 50; ID. DE SEQ. N°: 51; ID. DE SEQ. N°: 52; ID. DE SEQ. N°: 53; ID. DE SEQ. N°: 54; ID. DE SEQ. N°: 55; ID. DE SEQ. N°: 56; ID. DE SEQ. N°: 57; ID. DE SEQ. N°: 58.

[00166] A **FIG. 8** mostra frequências de hipermutação somática de cadeias pesadas e leves de anticorpos VELOCIMMUNE® marcados (após alinhamento com sequências de linhagem germinativa compatíveis) como percentual de sequências alteradas em cada nucleotídeo posição de (NT; coluna da esquerda) ou aminoácido (AA; coluna da direita) entre conjuntos de 38 (IgM não imunizada), 28 (IgG não

imunizada), 32 (Igk não imunizada de IgG), 36 (IgG imunizada) ou 36 (Igk imunizada de IgG) sequências. Barras sombreadas indicam as localizações das CDRs.

[00167] A **FIG. 9A** mostra os níveis de imunoglobulina sérica para os isótipos IgM e IgG em camundongos do tipo selvagem (barras abertas) ou VELOCIMMUNE® (barras fechadas).

[00168] A **FIG. 9B** mostra os níveis de imunoglobulina sérica para o isótipo IgA em camundongos do tipo selvagem (barras abertas) ou VELOCIMMUNE® (barras fechadas).

[00169] A **FIG. 9C** mostra os níveis de imunoglobulina sérica para o isótipo IgE em camundongos do tipo selvagem (barras abertas) ou VELOCIMMUNE® (barras fechadas).

[00170] A **FIG. 10A** mostra titulações de IgG antígeno-específica contra receptor de interleucina-6 (IL-6R) do soro de sete camundongos VELOCIMMUNE® (VI) e cinco do tipo selvagem (WT) após duas (sangria 1) ou três (sangria 2) rodadas de imunização com o ectodomínio de IL-6R.

[00171] A **FIG. 10B** mostra titulações isótipo-específicas de IgG anti-IL-6R-específica de sete camundongos VELOCIMMUNE® (VI) e cinco do tipo selvagem (WT).

[00172] A **FIG. 11A** mostra a distribuição de afinidade de anticorpos monoclonais anti-receptor de interleucina-6 gerados em camundongos VELOCIMMUNE®.

[00173] A **FIG. 11B** mostra o bloqueio antígeno-específico de anticorpos monoclonais anti-receptor de interleucina-6 gerados em camundongos VELOCIMMUNE® (VI) e do tipo selvagem (WT).

[00174] A **FIG. 12** mostra uma ilustração esquemática,

não em escala, de genes de ADAM6a e ADAM6b de camundongo em um locus da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo. Um vetor de direcionamento (vetor de direcionamento de mADAM6) usado para inserção de ADAM6a e ADAM6b de camundongo em um locus endógeno humanizado da cadeia pesada é mostrado com um cassete de seleção (HYG: higromicina) flanqueado por sítios de recombinação sítio-específicos (Frt) incluindo sítios de restrição geneticamente modificados nas extremidades 5' e 3'.

[00175] A FIG. 13 mostra uma ilustração esquemática, não em escala, de um pseudogene de ADAM6 humana (hADAM6Ψ) localizado entre segmentos do gene variável da cadeia pesada humana 1- 2 (V_H1-2) e 6-1 (V_H6-1). Um vetor de direcionamento para recombinação homóloga bacteriana (vetor de direcionamento de hADAM6Ψ) para deletar um pseudogene de ADAM6 humana e inserir sítios de restrição exclusivos em um locus da cadeia pesada humana é mostrado com um cassete de seleção (NEO: neomicina) flanqueado por sítios de recombinação sítio-específicos (loxP) incluindo sítios de restrição geneticamente modificados nas extremidades 5' e 3'. É mostrada uma ilustração, não em escala, do locus humanizado direcionado de cadeia pesada resultante que contém um fragmento genômico que codifica os genes de ADAM6a e ADAM6b de camundongo que incluem um cassete de seleção flanqueado por sítios de recombinação sítio-específicos.

[00176] A FIG. 14A mostra curvas de nível de FACS de linfócitos agrupados em singletos para expressão de superfície de IgM e B220 na medula óssea para camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada

humana e leve κ humana ($H^{+}/\kappa^{+}/+$) e camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana que possuem um fragmento genômico ectópico de camundongo que codifica genes de ADAM6 de camundongo ($H^{+}/A6^{res}\kappa^{+}/+$). A percentagem de células B imaturas ($B220^{int}IgM^{+}$) e maduras ($B220^{high}IgM^{+}$) é observada em cada curva de nível.

[00177] A **FIG. 14B** mostra o número total de células B imaturas ($B220^{int}IgM^{+}$) e maduras ($B220^{high}IgM^{+}$) na medula óssea isolada de fêmures de camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana ($H^{+}/\kappa^{+}/+$) e camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana que possuem um fragmento genômico ectópico de camundongo que codifica genes de ADAM6 de camundongo ($H^{+}/A6^{res}\kappa^{+}/+$).

[00178] A **FIG. 15A** mostra curvas de nível de FACS de células B $CD19^{+}$ agrupadas para expressão de superfície de c-kit e CD43 na medula óssea para camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana ($H^{+}/\kappa^{+}/+$) e camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana que possuem um fragmento genômico ectópico de camundongo que codifica genes de ADAM6 de camundongo ($H^{+}/A6^{res}\kappa^{+}/+$). A percentagem de células pró-B ($CD19^{+}CD43^{+}ckit^{+}$) e pré-B ($CD19^{+}CD43^{-}ckit^{-}$) é observada nos quadrantes direito superior e esquerdo inferior, respectivamente, de cada curva de nível.

[00179] A **FIG. 15B** mostra o número total de células pró-B ($CD19^{+}CD43^{+}ckit^{+}$) e pré-B células ($CD19^{+}CD43^{-}ckit^{-}$) na medula óssea isolada de fêmures de camundongos homozigotos

para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana ($H^{+}/\kappa^{+}/+$) e camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana que possuem um fragmento genômico ectópico de camundongo que codifica genes de ADAM6 de camundongo ($H^{+}/A6^{res}\kappa^{+}/+$).

[00180] A **FIG. 16A** mostra curvas de nível de FACS de linfócitos agrupados em singletos para expressão de superfície de CD19 e CD43 na medula óssea para camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana ($H^{+}/\kappa^{+}/+$) e camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana que possuem um fragmento genômico ectópico de camundongo que codifica genes de ADAM6 de camundongo ($H^{+}/A6^{res}\kappa^{+}/+$). A percentagem células de B imaturas ($CD19^{+}CD43^{-}$), pré-B ($CD19^{+}CD43^{int}$) e pró-B ($CD19^{+}CD43^{+}$) é observada em cada curva de nível.

[00181] A **FIG. 16B** mostra histogramas de células B imaturas ($CD19^{+}CD43^{-}$) e pré-B ($CD19^{+}CD43^{int}$) na medula óssea de camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana ($H^{+}/\kappa^{+}/+$) e camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana que possuem um fragmento genômico ectópico de camundongo que codifica genes de ADAM6 de camundongo ($H^{+}/A6^{res}\kappa^{+}/+$).

[00182] A **FIG. 17A** mostra curvas de nível de FACS de linfócitos agrupados em singletos para expressão de superfície de CD19 e CD3 em esplenócitos para camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana ($H^{+}/\kappa^{+}/+$) e camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ

humana que possuem um fragmento genômico ectópico de camundongo que codifica genes de ADAM6 de camundongo ($H^{+}/A6^{res}K^{+}/+$). Percentagem de células B ($CD19^{+}CD3^{-}$) e T ($CD19^{-}CD3^{+}$) é observada em cada curva de nível.

[00183] A **FIG. 17B** mostra curvas de nível de FACs para células B $CD19^{+}$ agrupadas para expressão de superfície de cadeia leve $Ig\lambda$ e $Ig\kappa$ no baço de camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana ($H^{+}/\kappa^{+}/+$) e camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana que possuem um fragmento genômico ectópico de camundongo que codifica genes de ADAM6 de camundongo ($H^{+}/A6^{res}K^{+}/+$). A percentagem de células B $Ig\lambda^{+}$ (quadrante superior esquerdo) e $Ig\kappa^{+}$ (quadrante inferior direito) é observada em cada curva de nível.

[00184] A **FIG. 17C** mostra o número total de células B $CD19^{+}$ no baço de camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana ($H^{+}/\kappa^{+}/+$) e camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana que possuem um fragmento genômico ectópico de camundongo que codifica genes de ADAM6 de camundongo ($H^{+}/A6^{res}K^{+}/+$).

[00185] A **FIG. 18A** mostra curvas de nível de FACs de células B $CD19^{+}$ agrupadas para expressão de superfície de IgD e IgM no baço de camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana ($H^{+}/\kappa^{+}/+$) e camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana que possuem um fragmento genômico ectópico de camundongo que codifica genes de ADAM6 de camundongo ($H^{+}/A6^{res}K^{+}/+$). A

percentagem de células B maduras ($CD19^+IgD^{high}IgM^{int}$) é observada para cada curva de nível. A seta na curva de nível da direita ilustra o processo de maturação para células B em relação à expressão de superfície de IgM e IgD.

[00186] A **FIG. 18B** mostra o número total de células B no baço de camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana ($H^{+}/\kappa^{+}/+$) e camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana que possuem um fragmento genômico ectópico de camundongo que codifica genes de ADAM6 de camundongo ($H^{+}/A6^{res}\kappa^{+}/+$) durante a maturação de $CD19^+IgM^{high}IgD^{int}$ em $CD19^+IgM^{int}IgD^{high}$.

[00187] A **FIG. 19** mostra a titulação de anticorpo para a primeira e segunda sangrias de camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana ($H^{+}/V^{+}; n = 5$) e camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana que possuem um fragmento genômico ectópico de camundongo que codifica genes de ADAM6 de camundongo ($H^{+}/A6^{res}\kappa^{+}/+; n = 5$) que foram imunizados com um receptor da superfície celular humano (Antígeno A).

[00188] A **FIG. 20** mostra a titulação de anticorpo para a primeira e segunda sangrias de camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana ($H^{+}/\kappa^{+}/+; n = 5$) e camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana que possuem um fragmento genômico ectópico de camundongo que codifica genes de ADAM6 de camundongo ($H^{+}/A6^{res}\kappa^{+}/+; n = 10$) que foram imunizados com um anticorpo humano específico

contrário seja claramente indicado ou claramente evidente a partir do contexto no qual o termo ou frase é usado. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, métodos e materiais particulares serão agora descritos. Todas as publicações mencionadas são aqui incorporadas por referência.

[00193] A frase “substancial” ou “substancialmente” quando usada para se referir a uma quantidade de segmentos gênicos (por exemplo, “substancialmente todos” os segmentos gênicos V) inclui segmentos gênicos tanto funcionais quanto não funcionais e incluem, em várias modalidades, por exemplo, 80% ou mais, 85% ou mais, 90% ou mais, 95% ou mais 96% ou mais, 97% ou mais, 98% ou mais, ou 99% ou mais de todos os segmentos gênicos; em várias modalidades, “substancialmente todos” os segmentos gênicos incluem, por exemplo, pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de segmentos gênicos funcionais (ou seja, não pseudogene).

[00194] O termo “substituição” inclui quando uma sequência de DNA é colocada em um genoma de uma célula de modo a substituir uma sequência dentro do genoma com uma sequência heteróloga (por exemplo, uma sequência humana em um camundongo), no locus da sequência genômica. A sequência de DNA assim colocada pode incluir uma ou mais sequências reguladoras que são parte do DNA-fonte usado para obter a sequência assim colocada (por exemplo, promotores, intensificadores, regiões não traduzidas 5' ou 3', sequências sinalizadoras de recombinação apropriadas etc.). Por exemplo, em várias modalidades, a substituição é uma substituição de uma sequência endógena para uma sequência

heteróloga que resulta na produção de um produto gênico pela sequência de DNA assim colocada (que compreende a sequência heteróloga), mas não a expressão da sequência endógena; a substituição é de uma sequência genômica endógena com uma sequência de DNA que codifica uma proteína que possui uma função similar à de uma proteína codificada pela sequência genômica endógena (por exemplo, a sequência genômica endógena codifica um gene ou domínio de imunoglobulina, e o fragmento de DNA codifica um ou mais genes ou domínios de imunoglobulina humana). Em várias modalidades, um gene endógeno ou fragmento deste é substituído com um gene humano correspondente ou fragmento deste. Um gene humano correspondente ou fragmento deste é um gene humano ou fragmento que é um ortólogo, um homólogo ou é substancialmente idêntico ou igual em estrutura e/ou função ao gene endógeno ou fragmento deste que é substituído.

[00195] O camundongo como um modelo genético foi acentuadamente aprimorado por tecnologias transgênicas e de knockout, que permitiram o estudo dos efeitos da superexpressão ou deleção direcionada de genes específicos. Apesar de todas suas vantagens, o camundongo ainda apresenta obstáculos genéticos que o tornam um modelo imperfeito para doenças humanas e uma plataforma imperfeita para testar substâncias terapêuticas humanas ou para produzi-las. Primeiro, embora cerca de 99% dos genes humanos tenham um homólogo em camundongo (Waterston e cols. 2002, "Initial Sequencing and Comparative Analysis of the Mouse Genome", *Nature* 420: 520-562), substâncias terapêuticas potenciais frequentemente não reagem de forma

cruzada, ou o fazem inadequadamente, com ortólogos de camundongo dos alvos humanos visados. Para solucionar esse problema, genes-alvo selecionados podem ser "humanizados", ou seja, o gene de camundongo pode ser eliminado e substituído pela sequência gênica humana ortóloga correspondente (por exemplo, US 6.586.251, US 6.596.541 e US 7.105.348, aqui incorporados por referência). Inicialmente, os esforços para humanizar genes de camundongo por uma estratégia de "humanização *knockout*-mais-transgênica" consistiam no cruzamento de um camundongo que carrega uma deleção (ou seja, *knockout*) do gene endógeno com um camundongo que carrega um transgene humano integrado aleatoriamente (veja, por exemplo, Bril e cols., 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 e cols., 2006, "Production and Characterization of Murine Models of Classic and Intermediate Maple Syrup Urine Disease", *BMC Med. Genet.* 7:33; Jamsai e cols., 2006, "A Humanized BAC Transgenic/Knockout Modelo in Mouse for HbE/beta-thalassemia", *Genomics* 88(3): 309-15; Pan e cols., 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: 1.741-1.750); mas aqueles esforços foram impedidos pelas limitações de tamanho; as tecnologias convencionais de *knockout* não eram suficientes para substituir diretamente genes de camundongo grandes com suas contrapartes genômicas humanas grandes. Uma abordagem

direta de substituição homóloga direta, na qual um gene endógeno de camundongo é substituído diretamente pelo gene humano de contraparte na mesma localização genética precisa do gene de camundongo (ou seja, no locus endógeno de camundongo), é raramente tentada por causa de dificuldades técnicas. Até agora, os esforços na substituição direta envolviam procedimentos elaborados e trabalhosos limitando, dessa forma, o comprimento do material genético que podia ser manipulado e a precisão com a qual podia ser manipulado.

[00196] Transgenes de imunoglobulina humana introduzidos de forma exógena reorganizam células B precursoras em camundongos (Alt e cols., 1985, "Immunoglobulin Genes in Transgenic Mice", Trends Genet. 1: 231-236). Esse achado foi explorado por modificação genética de camundongos com o uso da abordagem knockout-mais-transgênica para expressar anticorpos humanos (Green e cols., 1994, "Antigen-Specific Human Monoclonal Antibodies From Mice Engineered With Human Ig Heavy And Light Chain YACs", Nat. Genet. 7: 13-21; Lonberg e cols., 1994, "Antigen-Specific Human Antibodies From Mice Comprising Four Distinct Genetic Modifications", Nature 368: 856-859; Jakobovits e cols., 2007, "From Xenomouse Technology To Panitumumab, The First Fully Human Antibody Product From Transgenic Mice", Nat. Biotechnol. 25: 1.134-1.143). Os loci da cadeia pesada e da cadeia leve κ de imunoglobulina de camundongo foram inativados nesses camundongos por deleção direcionada de porções pequenas, mas cruciais, de cada locus endógeno, seguida por introdução de loci de gene de imunoglobulina humana como transgenes grandes integrados

aleatoriamente, como descrito acima, ou minicromossomos (Tomizuka e cols., 2000, "Double Trans-Chromosomic Mice: Maintenance of Two Individual Human Chromosome Fragments Containing Ig Heavy and Kappa Loci and Expression of Fully Human Antibodies", PNAS USA 97: 722-727). Esses camundongos representaram um avanço importante em engenharia genética; anticorpos monoclonais completamente humanos isolados deles geraram um potencial terapêutico promissor para o tratamento de diversas doenças humanas (Gibson e cols., 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 e cols., 2007; Kim e cols., 2007, "Clinical Efficacy of Zanolimumab (Humax-Cd4): Two Phase II Studies in Refractory Cutaneous T-Cell Lymphoma", Blood 109 (11): 4.655-62; Lonberg, 2005, Human Antibodies from Transgenic Animals", Nat. Biotechnol. 23: 1.117-1.125; Maker e cols., 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: 1.005-1.016; McClung e cols., 2006, "Denosumab in Postmenopausal Women with Low Bone Mineral Density", New Engl. J. Med. 354: 821-831). Mas, como discutido acima, esses camundongos exibem desenvolvimento comprometido de células B e deficiências imunes quando comparados com camundongos do tipo selvagem. Esses problemas potencialmente limitam a habilidade dos camundongos para suportar uma resposta humoral vigorosa e, conseqüentemente, gerar anticorpos totalmente humanos contra alguns antígenos. As deficiências podem ser causadas

por: (1) funcionalidade ineficiente em função da introdução aleatória dos transgenes de imunoglobulina humana e expressão incorreta resultante em função de uma ausência de elementos de controle acima e abaixo (Garrett e cols., 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: 1.511-1.525; Manis e cols., 2003, "Elucidation of A Downstream Boundary of The 3' Igh Regulatory Region", Mol. Immunol. 39: 753-760; Pawlitzky e cols., 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: 6.839-6.851); (2) interações interespecies ineficientes entre domínios constantes humanos e componentes de camundongo do complexo de sinalização de receptor de célula B na superfície celular, o que pode prejudicar processos de sinalização necessários à maturação, proliferação e sobrevivência normais de células B (Hombach e cols., 1990, "Molecular Components of The B-Cell Antigen Receptor Complex of the IgM Class", Nature 343: 760-762); e (3) interações interespecies ineficientes entre imunoglobulinas humanas solúveis e receptores Fc de camundongo que podem reduzir a seleção de afinidade (Rao e cols., 2002, "Differential Expression of The Inhibitory IgG Fc Receptor FcgammaRIIb on Germinal Center Cells: Implications for Selection of High-Affinity B Cells", J. Immunol. 169: 1.859-1.868) e concentrações séricas de imunoglobulina (Brambell e cols., 1964, "A Theoretical

Model of Gamma-Globulin Catabolism", Nature 203: 1.352-1.354; Junghans e Anderson, 1996, "The Protection Receptor For IgG Catabolism is the Beta2-Microglobulin-Containing Neonatal Intestinal Transport Receptor", PNAS USA 93: 5.512-5.516; Rao e cols., 2002; Hjelm e cols., 2006, "Antibody-Mediated Regulation of the Immune Response", Scand. J. Immunol. 64: 177-184; Nimmerjahn e Ravetch, 2007, "Fc-receptors as Regulators of Immunity", Adv. Immunol. 96: 179-204). Essas deficiências podem ser corrigidas por humanização in situ apenas das regiões variáveis dos loci de imunoglobulina de camundongo dentro de suas localizações naturais nos loci endógenos de cadeia pesada e leve. Isso resultaria eficazmente em camundongos que produzem anticorpos "quiméricos reversos" (ou seja, V humana:C de camundongo) que seriam capazes de interações e seleção normais com o ambiente do camundongo com base na retenção de regiões constantes de camundongo. Além disso, esses anticorpos quiméricos reversos podem ser facilmente reformatados em anticorpos totalmente humanos para fins terapêuticos.

[00197] Animais modificados geneticamente que compreendem uma substituição no locus endógeno da cadeia pesada de imunoglobulina com sequências de imunoglobulina heterólogas (por exemplo, de outra espécie) podem ser produzidos em conjunto com substituições em loci endógenos da cadeia leve de imunoglobulina ou em conjunto com transgenes da cadeia leve de imunoglobulina (por exemplo, transgenes quiméricos da cadeia leve de imunoglobulina ou completamente humanos, completamente de camundongo etc.). As espécies das quais as sequências heterólogas da cadeia

pesada de imunoglobulina são derivadas podem variar amplamente; assim como as sequências da cadeia leve de imunoglobulina empregadas em substituições da sequência da cadeia leve de imunoglobulina ou transgenes da cadeia leve de imunoglobulina.

[00198] As sequências de ácidos nucleicos da região variável de imunoglobulina, por exemplo, segmentos V, D e/ou J, são, em várias modalidades obtidas de um animal humano ou de um animal não humano. Animais não humanos adequados para o fornecimento de segmentos V, D e/ou J incluem, por exemplo, peixes ósseos, peixes cartilaginosos como, por exemplo, tubarões e arraias, anfíbios, répteis, mamíferos, pássaros (por exemplo, galinhas). Animais não humanos incluem, por exemplo, mamíferos. Mamíferos incluem, por exemplo, primatas não humanos, cabras, carneiros, porcos, cães, bovinos (por exemplo, vaca, touro, búfalo), veado, camelos, furões e roedores e primatas não humanos (por exemplo, chimpanzés, orangotangos, gorilas, saguis, macacos rhesus, babuínos). Animais não humanos adequados são selecionados da família dos roedores, incluindo ratos, camundongos e hamsters. Em uma modalidade, os animais não humanos são camundongos. Como evidente pelo contexto, vários animais não humanos podem ser usados como fontes de domínios variáveis ou segmentos do gene da região variável (por exemplo, tubarões, arraias, mamíferos (por exemplo, camelos, roedores como, por exemplo, camundongos e ratos)).

[00199] De acordo com o contexto, animais não humanos também são usados como fontes de sequências da região constante para serem usadas em conexão com sequências ou segmentos variáveis, por exemplo, sequências constantes de

roedores podem ser usadas em transgenes ligadas operacionalmente a sequências variáveis humanas ou não humanas (por exemplo, sequências variáveis humanas ou de primata não humano ligadas operacionalmente a, por exemplo, sequências constantes de roedor, por exemplo, de camundongo ou rato ou hamster). Dessa forma, em várias modalidades, segmentos V, D e/ou J humanos são ligados operacionalmente a sequências do gene da região constante de roedor (por exemplo, camundongo ou rato ou hamster). Em algumas modalidades, os segmentos V, D e/ou J humanos (ou um ou mais genes de VDJ ou VJ rearranjados) estão ligados operacionalmente ou fundidos a uma sequência do gene da região constante camundongo, rato ou hamster em, por exemplo, um transgene integrado em um locus que não é um locus endógeno de imunoglobulina.

[00200] Em uma modalidade específica, é fornecido um camundongo que compreende uma substituição de segmentos VH, DH e JH em um locus endógeno da cadeia pesada de imunoglobulina com um ou mais segmentos VH, DH e JH humanos, em que os (um ou mais) segmentos VH, DH e JH humanos estão ligados operacionalmente a um gene endógeno da cadeia pesada de imunoglobulina; em que o camundongo compreende um transgene em um locus diferente de um locus endógeno de imunoglobulina, em que o transgene compreende um segmento VL humano e JL humano não rearranjado ou rearranjado ligado operacionalmente a uma região constante de camundongo ou de rato ou humana.

[00201] É descrito um método para uma grande substituição genética in situ dos loci do gene variável de imunoglobulina da linhagem germinativa do camundongo com

loci do gene variável de imunoglobulina da linhagem germinativa humana mantendo, ao mesmo tempo, a habilidade dos camundongos para gerar prole. Especificamente, é descrita a substituição precisa de seis megabases dos loci do gene variável tanto da cadeia pesada quanto da cadeia leve κ de imunoglobulina de camundongo com suas contrapartes humanas deixando, ao mesmo tempo, as regiões constantes de camundongo intactas. Como resultado, foram criados camundongos que possuem uma substituição precisa de todo o seu repertório variável de imunoglobulina da linhagem germinativa com sequências variáveis de imunoglobulina da linhagem germinativa humana equivalente mantendo, ao mesmo tempo, regiões constantes de camundongo. As regiões variáveis humanas estão ligadas às regiões constantes de camundongo para formar loci quiméricos de imunoglobulina humanos-de camundongo que reorganizam e expressam em níveis fisiologicamente adequados. Os anticorpos expressos são "quimeras reversas", ou seja, eles compreendem sequências da região variável humana e sequências da região constante de camundongo. Esses camundongos que possuem regiões variáveis de imunoglobulina humanizadas que expressam anticorpos que possuem regiões variáveis humanas e regiões constantes de camundongo são denominados camundongos VELOCIMMUNE®.

[00202] Os camundongos humanizados VELOCIMMUNE® exibem um sistema imune humoral completamente funcional que é essencialmente indistinguível daquele de camundongos do tipo selvagem. Eles exibem populações de células normais em todos os estágios do desenvolvimento da célula B. Eles exibem morfologia de órgão linfóide normal. As sequências

de anticorpo de camundongos VELOCIMMUNE® exibem rearranjo V(D)J normal e frequências de hipermutação somática normais. As populações de anticorpos nesses camundongos refletem as distribuições de isótipos que resultam da mudança de classe normal (por exemplo, mudança de isótipo cis normal). A imunização de camundongos VELOCIMMUNE® resulta em respostas imunes humorais robustas que geram um repertório grande e diverso de anticorpos que possuem domínios variáveis de imunoglobulina humana adequados para uso como candidatos terapêuticos. Essa plataforma fornece uma fonte abundante de sequências da região variável de imunoglobulina humana naturalmente amadurecidas em termos de afinidade para produção de anticorpos farmacologicamente aceitáveis e outras proteínas de ligação de antígeno.

[00203] É a substituição precisa de sequências variáveis de imunoglobulina de camundongo com sequências variáveis de imunoglobulina humana que permite a produção de camundongos VELOCIMMUNE®. No entanto, uma substituição precisa de sequências endógenas de imunoglobulina de camundongo em loci de cadeia pesada e leve com sequências de imunoglobulina humana equivalentes, por recombinação sequencial de trechos muito grandes de sequências de imunoglobulina humana, pode apresentar certos desafios em função da evolução divergente dos loci de imunoglobulina entre camundongo e o homem. Por exemplo, sequências intergênicas dispersas dentro dos loci de imunoglobulina não são idênticas entre camundongos e humanos e, em algumas circunstâncias, podem não ser funcionalmente equivalentes. Diferenças entre camundongos e humanos em seus loci de imunoglobulina podem ainda resultar em anormalidades em

camundongos humanizados, particularmente quando se humanizam ou manipulam certas porções de loci endógenos da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo. Algumas modificações em loci da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo são deletérias. Modificações deletérias podem incluir, por exemplo, perda da habilidade dos camundongos modificados para acasalar e produzir prole.

[00204] Uma substituição *in situ* precisa, em larga escala, de seis megabases das regiões variáveis dos loci da cadeia pesada e leve de imunoglobulina de camundongo (VH-DH-JH e Vk-Jk) com as sequências genômicas humanas de 1,4 megabases correspondentes foi realizada deixando, ao mesmo tempo, as sequências de flanqueamento de camundongo intactas e funcionais dentro dos loci híbridos, incluindo todas as regiões de controle transcricional de genes e lócus da cadeia constante de camundongo (FIG. 1A e FIG. 1B). Especificamente, as sequências do gene de VH, DH, JH, Vk e Jk humanas foram introduzidas por meio de inserção em etapas de 13 vetores de direcionamento de BAC quiméricos que abrigam fragmentos superpostos dos loci variáveis da linhagem germinativa humana em células de camundongo ES usando a tecnologia de engenharia genética VELOCIGENE® (veja, por exemplo, Patente U.S. Nº 6.586.251 e Valenzuela e cols., 2003, "High-Throughput Engineering of the Mouse Genome Coupled with High-Resolution Expression Analysis", Nat. Biotechnol. 21 :652-659).

[00205] A humanização dos genes de imunoglobulina de camundongo representa a maior modificação genética ao genoma do camundongo até hoje. Embora esforços prévios com transgenes de imunoglobulina humana integrados

aleatoriamente tenham tido algum sucesso (discutido acima), a substituição direta dos genes de imunoglobulina de camundongo com suas contrapartes humanas aumenta dramaticamente a eficiência com a qual anticorpos completamente humanos podem ser eficientemente gerados em camundongos de outro modo normais. Além disso, esses camundongos exibem uma diversidade dramaticamente aumentada de anticorpos totalmente humanos que podem ser obtidos após imunização com praticamente qualquer antígeno, comparados com camundongos que abrigam loci endógenos desativados e transgenes de anticorpo totalmente humano. Múltiplas versões de loci humanizados substituídos exibem níveis completamente normais de células B maduras e imaturas, em contraste com camundongos com transgenes humanos integrados aleatoriamente, que exibem populações significativamente reduzidas de células B em vários estágios de diferenciação. Embora esforços para aumentar o número de segmentos gênicos humanos em camundongos transgênicos humanos tenham reduzidos esses defeitos, os repertórios expandidos de imunoglobulinas não corrigiram, no conjunto, reduções em populações de células B, comparados com camundongos do tipo selvagem.

[00206] Apesar da função imune humoral quase do tipo selvagem observada em camundongos com loci de imunoglobulina substituídos (ou seja, camundongos VELOCIMMUNE®), há outros desafios encontrados quando se emprega uma substituição direta da imunoglobulina que não é encontrada em algumas abordagens que empregam transgenes integrados aleatoriamente. Diferenças na composição genética dos loci de imunoglobulina entre camundongos e

humanos levaram à descoberta de sequências benéficas à propagação de camundongos com segmentos do gene de imunoglobulina substituídos. Especificamente, genes de ADAM de camundongo localizados dentro do locus endógeno de imunoglobulina estão otimamente presentes em camundongos com loci de imunoglobulina substituídos, em função de seu papel na fertilidade.

Localização genômica e função de ADAM6 de camundongo

[00207] Camundongos-macho que não possuem a habilidade para expressar qualquer proteína ADAM6 funcional exibem surpreendentemente um defeito na habilidade dos camundongos para acasalar e para gerar prole. Os camundongos não possuem a habilidade para expressar uma proteína ADAM6 funcional em virtude de uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos do gene da região variável de imunoglobulina de camundongo com segmentos do gene da região variável humana. A perda da função de ADAM6 ocorre porque o locus de ADAM6 está localizado dentro de uma região do locus endógeno do gene da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo, próximo à extremidade 3' do locus do segmento gênico VH que está acima dos segmentos gênicos DH. A fim de reproduzir camundongos que são homozigotos para uma substituição de todos ou substancialmente todos segmentos endógenos do gene variável da cadeia pesada de camundongo com segmentos do gene variável da cadeia pesada humana, é geralmente uma abordagem trabalhosa preparar machos e fêmeas que são, cada um, homozigotos para a substituição e aguardar um cruzamento produtivo. Ninhadas bem sucedidas têm frequência e tamanho reduzidos. Ao invés disso, foram empregados

machos heterozigotos para a substituição para cruzar com fêmeas homozigotas para a substituição para gerar uma prole que é heterozigota para a substituição, e depois cruzar um camundongo homozigoto dessa prole. Os inventores determinaram que a causa provável da perda da fertilidade nos camundongos-machos é a ausência em camundongos-machos homozigotos de uma proteína ADAM6 funcional.

[00208] Em vários aspectos, camundongos-machos que compreendem um gene de ADAM6 danificado (ou seja, não funcional ou marginalmente funcional) exibem uma redução ou eliminação da fertilidade. Como em camundongos (e outros roedores) o gene de ADAM6 está localizado no locus da cadeia pesada de imunoglobulina, os inventores determinaram que, a fim de propagar os camundongos, ou criar e manter uma cepa de camundongos que compreendem um locus da cadeia pesada de imunoglobulina substituído, são empregados vários esquemas de cruzamento ou propagação modificados. A fertilidade baixa, ou infertilidade, de camundongos-machos homozigotos para uma substituição do locus endógeno do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina torna difícil a manutenção de uma modificação desse tipo em uma cepa de camundongo. Em várias modalidades, a manutenção da cepa compreende evitar os problemas de infertilidade exibidos por camundongos-machos homozigotos para a substituição.

[00209] Em um aspecto, é fornecido um método para manutenção de uma cepa de camundongo como aqui descrito. A cepa de camundongo não precisa compreender uma sequência de ADAM6 ectópica e, em várias modalidades, a cepa de camundongo é homozigota ou heterozigota para um knockout (por exemplo, um knockout funcional) de ADAM6.

[00210] A cepa de camundongo compreende uma modificação de um locus endógeno da cadeia pesada de imunoglobulina que resulta em uma redução ou perda de fertilidade em um camundongo-macho. Em uma modalidade, a modificação compreende uma deleção de uma região reguladora e/ou uma região codificadora de um gene de ADAM6. Em uma modalidade específica, a modificação compreende uma modificação de um gene de ADAM6 endógeno (região reguladora e/ou codificadora) que reduz ou elimina a fertilidade de um camundongo-macho que compreende a modificação; em uma modalidade específica, a modificação reduz ou elimina a fertilidade de um camundongo-macho que é homozigoto para a modificação.

[00211] Em uma modalidade, a cepa de camundongo é homozigota ou heterozigota para um knockout (por exemplo, um knockout funcional) ou uma deleção de um gene de ADAM6.

[00212] Em uma modalidade, a cepa de camundongo é mantida por isolamento de um camundongo que é homozigoto ou heterozigoto para a modificação a célula, e emprego da célula doadora em embrião hospedeiro, e gestação do embrião hospedeiro e da célula doadora em uma mãe substituta, e obtenção da mãe substituta de uma prole que compreende a modificação genética. Em uma modalidade, a célula doadora é uma célula ES. Em uma modalidade, a célula doadora é uma célula pluripotente, por exemplo, uma célula pluripotente induzida.

[00213] Em uma modalidade, a cepa de camundongo é mantida por isolamento de um camundongo que é homozigoto ou heterozigoto para a modificação de uma sequência de ácido nucléico que compreende a modificação, e introdução da

sequência de ácido nucléico em um núcleo do hospedeiro, e gestação de uma célula que compreende a sequência de ácido nucléico e o núcleo do hospedeiro em um animal adequado. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico é introduzida em um embrião do oócito do hospedeiro.

[00214] Em uma modalidade, a cepa de camundongo é mantida por isolamento de um camundongo que é homozigoto ou heterozigoto para a modificação a núcleo, e introdução do núcleo em uma célula hospedeira, e gestação do núcleo e da célula hospedeira em um animal adequado para obter uma prole que é homozigota ou heterozigota para a modificação.

[00215] Em uma modalidade, a cepa de camundongo é mantida por emprego de fertilização in vitro (IVF) de um camundongo-fêmea (do tipo selvagem, homozigoto para a modificação, ou heterozigoto a modificação), emprego de um espermato de um camundongo-macho que compreende a modificação genética. Em uma modalidade, o camundongo-macho é heterozigoto para a modificação genética. Em uma modalidade, o camundongo-macho é homozigoto para a modificação genética.

[00216] Em uma modalidade, a cepa de camundongo é mantida por cruzamento de um camundongo-macho que é heterozigoto para a modificação genética com um camundongo-fêmea para obter uma prole que compreende a modificação genética, identificação de uma prole de machos e a fêmeas que compreendem a modificação genética, e emprego de um macho que é heterozigoto para a modificação genética em um cruzamento com uma fêmea que é do tipo selvagem, homozigota ou heterozigota para a modificação genética para obter uma prole que compreende a modificação genética. Em uma

modalidade, a etapa de cruzamento de um macho heterozigoto para a modificação genética com uma fêmea do tipo selvagem, uma fêmea heterozigota para a modificação genética ou uma fêmea homozigota para a modificação genética é repetida a fim de manter a modificação genética na cepa de camundongo.

[00217] Em um aspecto, é fornecido um método para manutenção de uma cepa de camundongo que compreende uma substituição de um locus endógeno do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina com uma ou mais sequências da cadeia pesada de imunoglobulina humana, que compreende o cruzamento da cepa de camundongo de modo a gerar camundongos-machos heterozigotos, em que os camundongos-machos heterozigotos são cruzados para manter a modificação genética na cepa. Em uma modalidade específica, a cepa não é mantida por qualquer cruzamento de um macho homozigoto com uma fêmea do tipo selvagem ou uma fêmea homozigota ou heterozigota para a modificação genética.

[00218] A proteína ADAM6 é um membro da família de proteínas ADAM, em que ADAM é um acrônimo para Desintegrina e Metaloprotease A. A família de proteínas ADAM é grande e diversa, com diversas funções, incluindo adesão celular. Alguns membros da família ADAM estão implicados na espermatogênese e fertilização. Por exemplo, ADAM2 codifica uma subunidade da proteína fertilina, que está implicada em interações espermato-óvulo. ADAM3, ou ciritestina, parece necessária para ligação do espermato à zona pelúcida. A ausência de ADAM2 ou ADAM3 resulta em infertilidade. Foi postulado que ADAM2, ADAM3 e ADAM6 formam um complexo na superfície de células do espermato de camundongo. O gene de ADAM6 humana, normalmente encontrado entre segmentos

gênicos VH humanos VH1-2 e VH6-1, parece ser um pseudogene (Figura 12). Em camundongos, há dois genes de ADAM6 - ADAM6a e ADAM6b - que são encontrados em uma região intergênica entre segmentos gênicos VH e DH de camundongo e, no camundongo, os genes de ADAM6a e ADAM6b estão orientados em orientação transcrricional oposta àquela dos segmentos circundantes do gene de imunoglobulina (FIG. 12). Em camundongos, um locus de ADAM6 funcional é aparentemente necessário à fertilização normal. Um locus ou sequência de ADAM6 funcional, então, se refere a um locus ou sequência de ADAM6 que pode complementar, ou resgatar, a fertilização drasticamente reduzida exibida em camundongos-machos com loci de ADAM6 endógenos ausentes ou não funcionais.

[00219] A posição da sequência intergênica em camundongos que codifica ADAM6a e ADAM6b torna a sequência intergênica suscetível à modificação quando se modifica uma cadeia pesada endógena de camundongo. Quando segmentos gênicos VH são deletados ou substituídos, ou quando segmentos gênicos DH são deletados ou substituídos, há uma probabilidade elevada de que um camundongo resultante exibirá um déficit grave na fertilidade. A fim de compensar o déficit, o camundongo é modificado para incluir uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína que irá complementar a perda na atividade de ADAM6 em função de uma modificação do locus endógeno de ADAM6 de camundongo. Em várias modalidades, a sequência de nucleotídeos de complementação é aquela que codifica uma ADAM6a de camundongo, uma ADAM6b de camundongo, ou um homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional destas, que resgata o déficit de fertilidade.

[00220] A sequência de nucleotídeos que resgata a fertilidade pode ser colocada em qualquer posição adequada. Ela pode ser colocada na região intergênica, ou em qualquer posição adequada no genoma (ou seja, ectopicamente). Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos pode ser introduzida em um transgene que se integra aleatoriamente no genoma do camundongo. Em uma modalidade, a sequência pode ser mantida de forma epissômica, ou seja, em um ácido nucléico separado, e não em um cromossomo de camundongo. Posições adequadas incluem posições que são transcricionalmente permissivas ou ativas, por exemplo, um locus ROSA26 (Zambrowicz e cols., 1997, *PNAS USA* 94: 3.789-3.794), um locus BT-5 (Michael e cols., 1999, *Mech. Dev.* 85: 35-47), ou um locus Oct4 (Wallace e cols., 2000, *Nucleic Acids Res.* 28: 1.455-1.464). O direcionamento de sequências de nucleotídeos aos loci transcricionalmente ativos é descrito, por exemplo, em US 7.473.557, aqui incorporado por referência.

[00221] Alternativamente, a sequência de nucleotídeos que resgata a fertilidade pode ser acoplada a um promotor indutível de modo a facilitar a expressão ótima nas células e/ou tecidos apropriados, por exemplo, tecidos reprodutivos. Promotores indutíveis exemplares incluem promotores ativados por meios físicos (por exemplo, promotor de choque térmico) e/ou químicos (por exemplo, IPTG ou tetraciclina).

[00222] Além disso, a expressão da sequência de nucleotídeos pode ser ligada a outros genes de modo a obter expressão em estágios de desenvolvimento específicos ou dentro de tecidos específicos. Essa expressão pode ser

obtida por colocação da sequência de nucleotídeos em ligação operacional com o promotor de um gene expresso em um estágio de desenvolvimento específico. Por exemplo, sequências de imunoglobulina de uma espécie modificadas geneticamente no genoma de uma espécie hospedeira são colocadas em ligação operacional com uma sequência promotora de um gene de CD19 (um gene específico de célula B) da espécie hospedeira. É obtida a expressão célula B-específica em estágios do desenvolvimento precisos quando as imunoglobulinas são expressas.

[00223] Ainda outro método para obter a expressão robusta de uma sequência de nucleotídeos inserida é o emprego de um promotor constitutivo. Promotores constitutivos exemplares incluem SV40, CMV, UBC, EF1A, PGK e CAGG. De forma similar, a sequência de nucleotídeos desejada é colocada em ligação operacional com um promotor constitutivo selecionado, o que fornece nível elevado de expressão da(s) proteína(s) codificada(s) pela sequência de nucleotídeos.

[00224] O termo "ectópica" visa incluir um deslocamento, ou uma colocação em uma posição que não é encontrada normalmente na natureza (por exemplo, colocação de uma sequência de ácido nucléico em uma posição que não é a mesma posição em que a sequência de ácido nucléico é encontrada em um camundongo do tipo selvagem). O termo, em várias modalidades, é usado no sentido de seu objeto estar fora de sua posição normal, ou adequada. Por exemplo, a frase "uma sequência de nucleotídeos ectópica que codifica..." se refere a uma sequência de nucleotídeos que aparece em uma posição na qual não é normalmente encontrada

no camundongo. Por exemplo, no caso de uma sequência de nucleotídeos ectópica que codifica um proteína ADAM6 de camundongo (ou um ortólogo ou homólogo ou fragmento desta que fornece o mesmo benefício de fertilidade ou um benefício similar nos camundongos-machos), a sequência pode ser colocada em uma posição diferente no genoma do camundongo do que é normalmente encontrada em um camundongo do tipo selvagem. Nesses casos, novas junções de sequências de sequência de camundongo serão criadas por colocação da sequência em uma posição diferente no genoma do camundongo do que em um camundongo do tipo selvagem. Um homólogo ou ortólogo funcional de ADAM6 de camundongo é uma sequência que confere um resgate da perda da fertilidade (por exemplo, perda da habilidade de um camundongo-macho para gerar prole por cruzamento) que é observada em um camundongo ADAM6-/-. Homólogos ou ortólogos funcionais incluem proteínas que possuem pelo menos cerca de 89% de identidade ou mais, por exemplo, até 99% de identidade, para a sequência de aminoácidos de ADAM6a e/ou para a sequência de aminoácidos de ADAM6b, e que pode complementar, ou resgatar, a habilidade para cruzar com sucesso, de um camundongo que possui um genótipo que inclui uma deleção ou knockout de ADAM6a e/ou ADAM6b.

[00225] A posição ectópica pode ser qualquer lugar (por exemplo, como com a inserção aleatória de um transgene que contém uma sequência de ADAM6 de camundongo), ou pode ser, por exemplo, em uma posição que se aproxima (mas não é precisamente a mesma que) de sua localização em um camundongo do tipo selvagem (por exemplo, em um locus endógeno modificado de imunoglobulina de camundongo, mas

acima ou abaixo de sua posição natural, por exemplo, dentro de um locus de imunoglobulina modificado, mas entre segmentos gênicos diferentes, ou em uma posição diferente em uma sequência intergênica V-D de camundongo). Um exemplo de uma colocação ectópica de colocação dentro de um locus humanizado da cadeia pesada de imunoglobulina. Por exemplo, um camundongo que compreende uma substituição de um ou mais segmentos gênicos VH endógenos com segmentos gênicos VH humanos, em que a substituição remove uma sequência de ADAM6 endógena, pode ser modificado geneticamente para ter uma sequência de ADAM6 de camundongo localizada dentro de uma sequência que contém os segmentos gênicos VH humanos. A modificação resultante geraria uma sequência (ectópica) de ADAM6 de camundongo dentro de uma sequência gênica humana, e a colocação (ectópica) da sequência de ADAM6 de camundongo dentro da sequência gênica humana pode se aproximar da posição do pseudogene de ADAM6 humana (ou seja, entre dois segmentos V) ou pode se aproximar da posição da sequência de ADAM6 de camundongo (ou seja, dentro da região intergênica V-D). As junções de sequências resultantes criadas pela união de uma sequência (ectópica) de ADAM6 de camundongo dentro ou adjacente a uma sequência gênica humana (por exemplo, um sequência do gene de imunoglobulina) dentro da linhagem germinativa do camundongo seriam inéditas, comparadas com a mesma posição ou uma posição similar no genoma de um camundongo do tipo selvagem.

[00226] Em várias modalidades, são fornecidos animais não humanos desprovidos de uma ADAM6 ou ortólogo ou homólogo desta, em que a ausência torna o animal não humano

infértil, ou reduz substancialmente a fertilidade do animal não humano. Em várias modalidades, a ausência de ADAM6 ou ortólogo ou homólogo desta é causada por uma modificação de um locus endógeno da cadeia pesada de imunoglobulina. Uma redução substancial na fertilidade é, por exemplo, uma redução na fertilidade (por exemplo, frequência de acasalamento, filhotes por ninhada, ninhadas por ano etc.) de cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 95% ou mais. Em várias modalidades, os animais não humanos são suplementados com um gene de ADAM6 de camundongo, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento funcional deste, que é funcional em um macho do animal não humano, em que o gene de ADAM6 suplementado, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento funcional deste, resgata a redução na fertilidade inteira ou em parte substancial. Um resgate da fertilidade em parte substancial é, por exemplo, uma restauração da fertilidade de tal forma que o animal não humano exiba uma fertilidade que é pelo menos 70%, 80% ou 90% ou mais, quando comparado com um locus da cadeia pesada não modificado (ou seja, um animal sem uma modificação do gene de ADAM6 ou ortólogo ou homólogo deste).

[00227] A sequência que confere ao animal geneticamente modificado (ou seja, o animal desprovido de uma ADAM6 funcional ou ortólogo ou homólogo desta, em consequência, por exemplo, de uma modificação de um locus da cadeia pesada de imunoglobulina) é, em várias modalidades, selecionada de um gene de ADAM6 ou ortólogo ou homólogo deste. Por exemplo, em um camundongo, a perda da função de ADAM6 é resgatada por adição, em uma modalidade, de um gene de ADAM6 de camundongo. Em uma modalidade, a perda da

função de ADAM6 no camundongo é resgatada por adição de um ortólogo ou homólogo de uma espécie intimamente relacionada com relação ao camundongo, por exemplo, um roedor, por exemplo, um camundongo de uma cepa ou espécie diferente, um rato de qualquer espécie, um roedor; em que a adição do ortólogo ou homólogo ao camundongo regata a perda de fertilidade em consequência da perda da função de ADAM6 ou perda de um gene de ADAM6. Ortólogos e homólogos de outras espécies, em várias modalidades, são selecionados de uma espécie filogeneticamente relacionada e, em várias modalidades, exibem uma identidade percentual com a ADAM6 endógena (ou ortólogo) que é cerca de 80% ou mais, 85% ou mais, 90% ou mais, 95% ou mais, 96% ou mais, ou 97% ou mais; e que que resgata a perda de fertilidade relacionada à ADAM6 ou (em um não camundongo) relacionada ao ortólogo de ADAM6. Por exemplo, em um rato-macho modificado geneticamente que é desprovido da função de ADAM6 (por exemplo, um rato com uma região variável endógena da cadeia pesada de imunoglobulina substituída com uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina humana, ou um knockout na região da cadeia pesada de imunoglobulina de rato), a perda da fertilidade no rato é resgatada por adição de uma ADAM6 de rato ou, em algumas modalidades, um ortólogo de uma ADAM6 de rato (por exemplo, um ortólogo de ADAM6 de outra cepa ou espécie rato ou, em uma modalidade, de um camundongo).

[00228] Dessa forma, em várias modalidades, animais geneticamente modificados que não exibem nenhuma fertilidade ou uma redução na fertilidade em consequência de modificação de uma sequência de ácido nucléico que

codifica uma proteína ADAM6 (ou ortólogo ou homólogo desta) ou uma região reguladora ligada operacionalmente à sequência de ácido nucléico, compreendem uma sequência de ácido nucléico que complementa, ou restaura, a perda de fertilidade, em que a sequência de ácido nucléico que complementa ou restaura a perda de fertilidade é de uma cepa diferente da mesma espécie ou de uma espécie filogeneticamente relacionada. Em várias modalidades, a sequência de ácido nucléico de complementação é um ortólogo de ADAM6, ou homólogo ou fragmento funcional deste. Em várias modalidades, o ortólogo de ADAM6 de complementação, ou homólogo ou fragmento funcional deste, é de um animal não humano que é intimamente relacionado ao animal geneticamente modificado que possui o defeito de fertilidade. Por exemplo, quando o animal geneticamente modificado é um camundongo de uma cepa em particular, um ortólogo de ADAM6, ou homólogo ou fragmento funcional deste, pode ser obtido de um camundongo de outra cepa, ou um camundongo de uma espécie relacionada. Em uma modalidade, quando o animal geneticamente modificado que compreende o defeito de fertilidade é da ordem Rodentia, o ortólogo de ADAM6, ou homólogo ou fragmento funcional deste, é de outro animal da ordem Rodentia. Em uma modalidade, o animal geneticamente modificado que compreende o defeito de fertilidade é de uma subordem Myomorpha (por exemplo, gerbos, camundongos saltadores, hamsters camundongo-like, hamsters, ratos e camundongos do Novo Mundo, arganazes, camundongos e ratos verdadeiros, ratos-do-deserto, ratos-de-espinho, ratos cristados, ratos arborícolas, ratos da montanha, ratos-de-cauda-branca,

ratos e camundongos de Madagascar, rato-de-campo espinhoso, ratos pelados, ratos do bambu, zokors), e o ortólogo de ADAM6, ou homólogo ou fragmento funcional deste, é selecionado de um animal da ordem Rodentia, ou da subordem Myomorpha.

[00229] Em uma modalidade, o animal geneticamente modificado é da superfamília Dipodoidea, e o ortólogo de ADAM6, ou homólogo ou fragmento funcional deste, é da superfamília Muroidea. Em uma modalidade, o animal geneticamente modificado é da superfamília Muroidea, e o ortólogo de ADAM6, ou homólogo ou fragmento funcional deste, é da superfamília Dipodoidea.

[00230] Em uma modalidade, o animal geneticamente modificado é um roedor. Em uma modalidade, o roedor é selecionado da superfamília Muroidea, e o ortólogo ou homólogo de ADAM6 é de uma espécie diferente dentro da superfamília Muroidea. Em uma modalidade, o animal geneticamente modificado é de uma família selecionada de Calomyscidae (por exemplo, hamsters camundongo-like), Cricetidae (por exemplo, hamster, ratos e camundongos do Novo Mundo, arganazes), Muridae (camundongos e ratos verdadeiros, ratos-do-deserto, ratos-de-espinho, ratos cristados), Nesomyidae (ratos arborícolas, ratos da montanha, ratos-de-cauda-branca, ratos e camundongos de Madagascar), Platacanthomyidae (por exemplo, rato-de-campo espinhoso), e Spalacidae (por exemplo, ratos pelados, ratos do bambu, e zokors); e o ortólogo ou homólogo de ADAM6 é selecionado de uma espécie diferente da mesma família. Em uma modalidade específica, o roedor geneticamente modificado é selecionado de um camundongo ou rato

verdadeiro (família Muridae), e o ortólogo ou homólogo de ADAM6 é de uma espécie selecionada de um rato-do-deserto, rato-de-espinho ou rato cristado. Em uma modalidade, o camundongo geneticamente modificado é de um membro da família Muridae, e o ortólogo ou homólogo de ADAM6 é de uma espécie diferente da família Muridae. Em uma modalidade específica, o roedor geneticamente modificado é um camundongo da família Muridae, e o ortólogo ou homólogo de ADAM6 é de um rato, ratos-do-deserto, rato-de-espinho ou rato cristado da família Muridae.

[00231] Em várias modalidades, um ou mais ortólogos de ADAM6 de roedor, ou homólogos ou fragmentos funcionais destes, de um roedor em uma família restaura a fertilidade a um roedor geneticamente modificado da mesma família que não possui um ortólogo ou homólogo de ADAM6 (por exemplo, Cricetidae (por exemplo, hamsters, ratos e camundongos do Novo Mundo, arganazes); Muridae (por exemplo, camundongos e ratos verdadeiros, ratos-do-deserto, ratos-de-espinho, ratos cristados)).

[00232] Em várias modalidades, ortólogos de ADAM6, homólogos, e fragmentos destes são avaliados quanto à funcionalidade verificando-se se o ortólogo, homólogo ou fragmento restaura a fertilidade e um animal não humano macho geneticamente modificado desprovido de atividade de ADAM6 (por exemplo, um roedor, por exemplo, um camundongo ou rato, que compreende um knockout de ADAM6 ou seu ortólogo). Em várias modalidades, a funcionalidade é definida como a habilidade de um esperma de um animal geneticamente modificado desprovido de uma ADAM6 endógena, ou ortólogo ou homólogo desta, para migrar até um oviduto e

fertilizar um óvulo da mesma espécie do animal geneticamente modificado.

[00233] Em vários aspectos, podem ser produzidos camundongos que compreendem deleções ou substituições do locus endógeno da região variável da cadeia pesada, ou porções deste, que contêm uma sequência de nucleotídeos ectópica que codifica uma proteína que confere benefícios de fertilidade similares à ADAM6 de camundongo (por exemplo, um ortólogo ou um homólogo ou um fragmento desta que é funcional em um camundongo-macho). A sequência de nucleotídeos ectópica pode incluir uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína que é um homólogo ou ortólogo de ADAM6 (ou fragmento deste) de uma cepa diferente de camundongo ou de uma espécie diferente, por exemplo, uma espécie de roedor diferente, e que confere um benefício na fertilidade, por exemplo, número aumentado de ninhadas ao longo de um período de tempo especificado, e/ou número aumentado de filhotes por ninhada, e/ou a habilidade de uma célula do esperma de um camundongo-macho para atravessar através de um oviduto de camundongo para fertilizar um óvulo de camundongo.

[00234] Em uma modalidade, a ADAM6 é um homólogo ou ortólogo que é pelo menos 89% a 99% idêntico a uma proteína ADAM6 de camundongo (por exemplo, pelo menos 89% a 99% idêntico à ADAM6a de camundongo ou ADAM6b de camundongo). Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos ectópica codifica uma ou mais proteínas selecionadas independentemente de uma proteína pelo menos 89% idêntica à ADAM6a de camundongo, uma proteína pelo menos 89% idêntica à ADAM6b de camundongo, e uma combinação destas. Em uma

modalidade, o homólogo ou ortólogo é uma proteína de rato, hamster, camundongo ou porquinho-da-índia que é ou está modificada para ser cerca de 89% ou mais idêntica à ADAM6a de camundongo e/ou à ADAM6b de camundongo. Em uma modalidade, o homólogo ou ortólogo é ou é pelo menos 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntico a uma ADAM6a de camundongo e/ou ADAM6b de camundongo.

ADAM6 ectópica em camundongos com cadeia pesada humanizada

[00235] O desenvolvimento no direcionamento de genes, por exemplo, o desenvolvimento de cromossomos bacterianos artificiais (BACs), permite agora a recombinação de fragmentos genômicos relativamente grandes. A engenharia de BAC forneceu a habilidade para produzir grandes deleções e grandes inserções, em células de camundongo ES.

[00236] Camundongos que produzem anticorpos humanos já estão disponíveis há algum tempo. Embora eles representem um avanço importante no desenvolvimento de anticorpos terapêuticos humanos, esses camundongos exibem diversas anormalidades significantes que limitam sua utilidade. Por exemplo, eles exibem desenvolvimento comprometido de célula B. O desenvolvimento comprometido pode ser causado por várias diferenças entre os camundongos transgênicos e os camundongos do tipo selvagem.

[00237] Anticorpos humanos podem não interagir otimamente com pré-células B ou receptores de célula B de camundongo na superfície das células de camundongo que sinalizam maturação, proliferação ou sobrevivência durante seleção clonal. Anticorpos totalmente humanos podem não interagir otimamente com um sistema de receptor Fc de

camundongo; camundongos expressam receptores Fc que não exibem uma correspondência de um-para-um com receptores Fc humanos. Finalmente, vários camundongos que produzem anticorpos totalmente humanos não incluem todas as sequências de camundongo genuínas, por exemplo, elementos intensificadores abaixo e outros elementos de controle do locus, que podem ser necessários para o desenvolvimento de células B do tipo selvagem.

[00238] Camundongos que produzem anticorpos totalmente humanos geralmente compreendem loci endógenos de imunoglobulina que são de alguma forma desativados, e transgenes humanos que compreendem segmentos variáveis e constantes do gene de imunoglobulina são introduzidos em uma localização aleatória no genoma do camundongo. Desde que o locus endógeno seja suficientemente desativado de modo a não rearranjar segmentos gênicos para formar um gene de imunoglobulina funcional, o objetivo da produção de anticorpos totalmente humanos em um camundongo desse tipo pode ser obtido, apesar do desenvolvimento comprometido de células B.

[00239] Embora compelido a produzir anticorpos totalmente humanos a partir do locus de transgene humano, a geração de anticorpos humanos em um camundongo é aparentemente um processo não preferido. Em alguns camundongos, o processo tão desfavorecido a ponto de resultar na formação de cadeias quiméricas pesadas variáveis humanas/constantes de camundongo (mas não cadeias leves) por meio do mecanismo de trans-switching. Por esse mecanismo, transcritos que codificam anticorpos totalmente humanos passam por mudança de isótipo em trans do isótipo

humano para um isótipo de camundongo. O processo é em trans, pois o transgene completamente humano está localizado longe do locus endógeno que retém uma cópia não danificada de um gene da região constante da cadeia pesada de camundongo. Embora nesses camundongos o trans-switching seja facilmente evidente, o fenômeno ainda é insuficiente para resgar o desenvolvimento de células B, que permanece francamente prejudicado. Em qualquer evento, anticorpos trans-switched produzidos nesses camundongos retêm cadeias leves completamente humanas, na medida em que o fenômeno de trans-switching aparentemente não ocorre com relação às cadeias leves; o trans-switching presumivelmente se baseia na mudança de sequências em loci endógenos usados (apesar de diferentemente) na mudança de isótipo normal em cis. Dessa forma, até mesmo quando camundongos modificados geneticamente para produzir anticorpos totalmente humanos selecionam uma mecanismo de trans-switching para produzir anticorpos com regiões constantes de camundongo, a estratégia ainda é insuficiente para resgatar o desenvolvimento normal de células B.

[00240] Uma preocupação primária na produção de substâncias terapêuticas humanas à base de anticorpo é a produção de uma diversidade suficientemente grande de sequências da região variável de imunoglobulina humana para identificar domínios variáveis úteis que reconhecem especificamente epitopos particulares e os ligam com uma afinidade desejada, normalmente, mas nem sempre, com afinidade elevada. Antes do desenvolvimento de camundongos VELOCIMMUNE® (aqui descritos), não havia indicação de que camundongos que expressam regiões variáveis humanas com

regiões constantes de camundongo exibiriam quaisquer diferenças significantes de camundongos que produziam anticorpos humanos a partir de um transgene. Aquela suposição, no entanto, era incorreta.

[00241] Camundongos VELOCIMMUNE®, que contêm uma substituição precisa de regiões variáveis de imunoglobulina de camundongo com regiões variáveis de imunoglobulina humana nos loci endógenos de camundongo, exibem uma similaridade surpreendente e marcante com camundongos do tipo selvagem com relação ao desenvolvimento de células B. Em um desenvolvimento surpreendente e impressionante, camundongos VELOCIMMUNE® exibiam uma resposta do tipo selvagem, essencialmente normal, à imunização que diferia apenas em um aspecto significativo em relação aos camundongos do tipo selvagem: as regiões variáveis geradas em resposta à imunização são completamente humanas.

[00242] Camundongos VELOCIMMUNE® contêm uma substituição precisa, de larga escala, de regiões variáveis de linhagem germinativa de cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo (IgH) e cadeia leve de imunoglobulina (por exemplo, cadeia leve κ , Igk) com regiões variáveis de imunoglobulina humana correspondentes, nos loci endógenos. No total, cerca de seis megabases de loci de camundongo são substituídos com cerca de 1,5 megabases de sequência genômica humana. Essa substituição precisa resulta em um camundongo com loci de imunoglobulina híbridos que produzem cadeias pesadas e leves que possuem regiões variáveis humanas e uma região constante de camundongo. A substituição precisa de camundongo segmentos VH-DH-JH e V κ -J κ deixa sequências de flanqueamento de camundongo intactas

e funcionais nos loci de imunoglobulina híbridos. O sistema imune humoral do camundongo funciona como aquele de um camundongo do tipo selvagem. O desenvolvimento de células B não é prejudicado em qualquer aspecto significativo e uma rica diversidade de regiões variáveis humanas é gerada no camundongo após ataque de antígeno.

[00243] Camundongos VELOCIMMUNE® são possíveis porque os segmentos do gene de imunoglobulina para cadeias pesadas e leves κ se reorganizam similarmente em humanos e camundongos, o que não equivale a dizer que seus loci são os mesmos ou quase os mesmos, já que claramente eles não o são. No entanto, os loci são suficientemente similares para que a humanização do locus do gene variável da cadeia pesada possa ser obtida por substituição de cerca de três milhões de pares de bases de sequência de camundongo contígua que contém todos os segmentos gênicos VH, DH e JH com cerca de um milhão de bases de sequência genômica humana contígua, cobrindo basicamente a sequência equivalente de um locus de imunoglobulina humana.

[00244] Em algumas modalidades, a substituição adicional de certas sequências do gene da região constante de camundongo com sequências gênicas humanas (por exemplo, substituição de sequência de CH1 de camundongo com sequência de CH1 humana, e substituição de sequência de CL camundongo com sequência de CL humana) resulta em camundongos com loci de imunoglobulina híbridos que produzem anticorpos que possuem regiões variáveis humanas e regiões constantes parcialmente humanas, adequadas, por exemplo, à produção de fragmentos de anticorpos totalmente humanos, por exemplo, Fabs completamente humanos.

Camundongos com loci de imunoglobulina híbridos exibem rearranjo normal do segmento gênico variável, frequências normais de hipermutação somática e mudança de classe normal. Esses camundongos exibem um sistema imune humoral que é indistinguível de camundongos do tipo selvagem, e exibem populações normais de células em todos os estágios de desenvolvimento de células B e estruturas normais de órgãos linfóides - até mesmo quando os camundongos não possuem um repertório completo de segmentos do gene da região variável humana. A imunização desses camundongos resulta em respostas humorais robustas que exibem uma ampla diversidade de uso do segmento gênico variável.

[00245] A substituição precisa de segmentos do gene da região variável da linhagem germinativa de camundongo permite a produção de camundongos que possuem loci de imunoglobulina parcialmente humanos. Como os loci de imunoglobulina parcialmente humanos se rearranjam, sofrem hipermutações e mudança de classe normalmente, os loci de imunoglobulina parcialmente humanos geram anticorpos em um camundongo que compreendem regiões variáveis humanas. As sequências de nucleotídeos que codificam as regiões variáveis podem ser identificadas e clonadas, e depois fundidas (por exemplo, em um sistema in vitro) com quaisquer sequências de escolha, por exemplo, qualquer isótipo de imunoglobulina adequado a um uso particular, resultando em um anticorpo ou proteína de ligação de antígeno derivada totalmente de sequências humanas.

[00246] A humanização em larga escala por métodos de recombinação foi usada para modificar células-tronco embrionárias de camundongo (ES) para substituir

precisamente até três megabases do locus da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo que incluíam essencialmente todos os segmentos gênicos V_H , D_H e J_H de camundongo com segmentos gênicos humanos equivalentes com uma sequência genômica humana de até uma megabase contendo alguns ou essencialmente todos os segmentos gênicos V_H , D_H e J_H humanos. Um segmento de até meia megabase do genoma humano que compreende uma das duas repetições que codificam essencialmente todos os segmentos gênicos V_K e J_K humanos foi usado para substituir um segmento de três megabases do locus da cadeia leve κ de imunoglobulina de camundongo contendo essencialmente todos os segmentos gênicos V_K e J_K de camundongo.

[00247] Camundongos com esses loci de imunoglobulina substituídos podem compreender uma ruptura ou deleção do locus endógeno de ADAM6 de camundongo, que é normalmente encontrada entre o segmento gênico V_H mais 3' e o segmento gênico D_H mais 5' no locus da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo. A ruptura nessa região pode levar à redução ou eliminação da funcionalidade do locus endógeno de ADAM6 de camundongo. Se os segmentos gênicos V_H mais 3' do repertório de cadeia pesada humana são usados em uma substituição, uma região intergênica que contém um pseudogene que parece ser um pseudogene de ADAM6 humana está presente entre esses segmentos gênicos V_H , ou seja, entre $VH1-2$ e $VH1-6$ humanas. No entanto, camundongos-machos que compreendem essa sequência intergênica humana exibem uma redução na fertilidade.

[00248] São descritos camundongos que compreendem os loci substituídos como descritos acima, e que também

compreendem uma sequência de ácido nucléico ectópica que codifica uma ADAM6 de camundongo, em que os camundongos exibem fertilidade essencialmente normal. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico ectópica compreende uma sequência de ADAM6a de camundongo e/ou uma sequência de ADAM6b de camundongo, ou fragmentos funcionais destas, colocada entre uma VH1-2 humana e uma VH6-1 humana em um locus endógeno modificado da cadeia pesada. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico ectópica é o ID. DE SEQ. Nº: 3, colocada entre uma VH1-2 humana e uma VH6-1 humana em um locus endógeno modificado da cadeia pesada. A direção de transcrição dos genes de ADAM6 do ID. DE SEQ. Nº: 3 são opostas com relação à direção de transcrição dos segmentos gênicos VH humanos circundantes. Embora os exemplos aqui apresentados mostrem o resgate da fertilidade por colocação da sequência ectópica entre os segmentos gênicos VH humanos indicados, aqueles habilitados na técnica reconhecerão que a colocação da sequência ectópica em qualquer locus transcricionalmente permissível adequado no genoma do camundongo (ou até mesmo de forma extracromossômica) provavelmente resgatará similarmente a fertilidade em um camundongo-macho.

[00249] O fenômeno de complementação de um camundongo desprovido de um locus de ADAM6 funcional com uma sequência ectópica que compreende um gene de ADAM6 de camundongo, ou ortólogo ou homólogo ou fragmento funcional deste, é um método geral que é aplicável ao resgate de quaisquer camundongos com loci endógenos de ADAM6 não funcionais ou minimamente funcionais. Dessa forma, uma grande parte dos camundongos que compreendem uma modificação de ruptura de

ADAM6 do lócus da cadeia pesada de imunoglobulina pode ser resgatada com as composições e métodos da invenção. Consequentemente, a invenção compreende camundongos com uma ampla variedade de modificações de loci da cadeia pesada de imunoglobulina que comprometem a função endógena de ADAM6. Alguns exemplos (não limitantes) são fornecidos nessa descrição. Além dos camundongos VELOCIMMUNE® descritos, as composições e métodos relacionados à ADAM6 podem ser usados em muitas aplicações, por exemplo, quando se modifica um lócus da cadeia pesada de várias formas.

[00250] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que compreende uma sequência ectópica de ADAM6 que codifica uma proteína ADAM6 funcional (ou ortólogo ou homólogo ou fragmento funcional desta), uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos VH de camundongo com um ou mais segmentos gênicos VH humanos, uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos DH e segmentos gênicos JH de camundongo com segmentos gênicos DH e JH humanos; em que o camundongo não possui uma região CH1 e/ou de dobradiça. Em uma modalidade, o camundongo produz uma única proteína de ligação do domínio variável que é um dímero de cadeias de imunoglobulina selecionado de: (a) VH humana - CH1 de camundongo - CH2 de camundongo - CH3 de camundongo; (b) VH humana - dobradiça de camundongo - CH2 de camundongo - CH3 de camundongo; e, (c) VH humana - CH2 de camundongo - CH3 de camundongo.

[00251] Em um aspecto, a sequência de nucleotídeos que resgata fertilidade é colocada dentro de uma sequência da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina humana

(por exemplo, entre segmentos gênicos VH1-2 e VH1-6 humanos) em um camundongo que possui uma substituição de um ou mais segmentos do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo (mVH's, mDH's e/ou mJH's) com um ou mais segmentos do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina humana (hVH's, hDH's e/ou hJH's), e o camundongo ainda compreende uma substituição de um ou mais segmentos do gene variável da cadeia leve κ de imunoglobulina de camundongo (mVk's e/ou mJk's) com um ou mais segmentos do gene variável da cadeia leve κ de imunoglobulina humana (hVk's e/ou hJk's).

[00252] Em uma modalidade, os (um ou mais) segmentos do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo compreendem cerca de três megabases do locus da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo. Em uma modalidade, os (um ou mais) segmentos do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo compreendem pelo menos 89 segmentos gênicos VH, pelo menos 13 segmentos gênicos DH, pelo menos quatro segmentos gênicos JH ou uma combinação destes do locus da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo. Em uma modalidade, os (um ou mais) segmentos do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina humana compreendem cerca de uma megabase de um locus da cadeia pesada de imunoglobulina humana. Em uma modalidade, os (um ou mais) segmentos do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina humana compreendem pelo menos 80 segmentos gênicos VH, pelo menos 27 segmentos gênicos DH, pelo menos seis segmentos gênicos JH ou uma combinação destes de um locus da cadeia pesada de imunoglobulina humana.

[00253] Em uma modalidade, os (um ou mais) segmentos do gene variável da cadeia leve κ de imunoglobulina de camundongo compreendem cerca de três megabases do locus da cadeia leve κ de imunoglobulina de camundongo. Em uma modalidade, os (um ou mais) segmentos do gene variável da cadeia leve κ de imunoglobulina de camundongo compreendem pelo menos 137 segmentos gênicos V_{κ} , pelo menos cinco segmentos gênicos J_{κ} ou uma combinação destes do locus da cadeia leve κ de imunoglobulina de camundongo. Em uma modalidade, os (um ou mais) segmentos do gene da cadeia leve κ de imunoglobulina humana variáveis compreendem cerca de meia megabase de um locus da cadeia leve κ de imunoglobulina humana. Em uma modalidade específica, os (um ou mais) segmentos do gene da cadeia leve κ de imunoglobulina humana variáveis compreendem a repetição proximal (com relação à região constante κ de imunoglobulina) de um locus da cadeia leve κ de imunoglobulina humana. Em uma modalidade, os (um ou mais) segmentos do gene da cadeia leve κ de imunoglobulina humana variáveis compreendem pelo menos 40 segmentos gênicos V_{κ} , pelo menos cinco segmentos gênicos J_{κ} , ou uma combinação destes, de um locus da cadeia leve κ de imunoglobulina humana.

[00254] Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos é colocada entre dois segmentos do gene de imunoglobulina humana. Em uma modalidade específica, os dois segmentos do gene de imunoglobulina humana são segmentos do gene da cadeia pesada. Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos é colocada entre um segmento gênico VH1-2 humano e um segmento gênico VH1-6 humano em um camundongo

VELOCIMMUNE® (US 6.596.541 e US 7.105.348, aqui incorporados por referência). Em uma modalidade, o camundongo VELOCIMMUNE® assim modificado compreende uma substituição de segmentos do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo com pelo menos 80 segmentos gênicos VH humanos, 27 segmentos gênicos DH humanos e seis segmentos gênicos JH humanos, e uma substituição de segmentos do gene variável da cadeia leve κ de imunoglobulina de camundongo com pelo menos 40 segmentos gênicos Vk humanos e cinco segmentos gênicos Jk humanos.

[00255] Em um aspecto, um locus funcional de ADAM6 de camundongo (ou ortólogo ou homólogo ou fragmento funcional deste) está presente no meio de segmentos gênicos VH humanos que substituem segmentos gênicos VH endógenos de camundongo. Em uma modalidade, pelo menos 89 segmentos gênicos V_H de camundongo são removidos e substituídos com um ou mais segmentos gênicos V_H humanos, e o locus de ADAM6 de camundongo está presente imediatamente adjacente à extremidade 3' dos segmentos gênicos V_H humanos, ou entre dois segmentos gênicos V_H humanos. Em uma modalidade específica, o locus de ADAM6 de camundongo está presente entre dois segmentos gênicos V_H dentro de cerca de 20 quilobases (kb) até cerca de 40 quilobases (kb) do terminal 3' dos segmentos gênicos V_H humanos inseridos. Em uma modalidade específica, o locus de ADAM6 de camundongo está presente entre dois segmentos gênicos V_H dentro de cerca de 29 kb até cerca de 31 kb do terminal 3' dos segmentos gênicos V_H humanos inseridos. Em uma modalidade específica, o locus de ADAM6 de camundongo está presente dentro de cerca de 30 kb do terminal 3' dos segmentos gênicos V_H

humanos inseridos. Em uma modalidade específica, o locus de ADAM6 de camundongo está presente dentro de cerca de 30,184 bp do terminal 3' dos segmentos gênicos V_H humanos inseridos. Em uma modalidade específica, a substituição inclui segmentos gênicos V_H humanos V_{H1-2} e V_{H6-1} , e o locus de ADAM6 de camundongo está presente abaixo do segmento gênico V_{H1-2} e acima do segmento gênico V_{H6-1} . Em uma modalidade específica, o locus de ADAM6 de camundongo está presente entre um segmento gênico V_{H1-2} humano e um segmento gênico V_{H6-1} humano, em que a extremidade 5' do locus de ADAM6 de camundongo está cerca de 13.848 bp do terminal 3' do segmento gênico V_{H1-2} humano e a extremidade 3' do locus de ADAM6 está cerca de 29.737 bp 5' do segmento gênico V_{H6-1} humano. Em uma modalidade específica, o locus de ADAM6 de camundongo compreende o ID. DE SEQ. N°: 3 ou um fragmento deste que confere função de ADAM6 dentro de células do camundongo. Em uma modalidade específica, o arranjo de segmentos gênicos V_H humanos é então o seguinte (de cima para baixo com relação à direção de transcrição dos segmentos gênicos V_H humanos): V_{H1-2} humana - locus de ADAM6 de camundongo - V_{H6-1} humana. Em uma modalidade específica, o pseudogene de ADAM6 entre V_{H1-2} humana e V_{H6-1} humana é substituído com o locus de ADAM6 de camundongo. Em uma modalidade, a orientação de um ou mais de ADAM6a de camundongo e ADAM6b de camundongo do locus de ADAM6 de camundongo é oposta com relação à direção de transcrição, comparada com a orientação dos segmentos gênicos V_H humanos. Alternativamente, o locus de ADAM6 de camundongo está presente na região intergênica entre o segmento gênico V_H humano mais 3' e o segmento gênico D_H mais 5'. Esse pode

ser o caso se o segmento D_H mais 5' é de camundongo ou humano.

[00256] Similarmente, um camundongo modificado com um ou mais segmentos gênicos V_L humanos (por exemplo, segmentos V_K ou V_λ) que substituem todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos V_H endógenos de camundongo podem ser modificados de modo a manter o locus endógeno de ADAM6 de camundongo, como descrito acima, por exemplo, pelo emprego de um vetor de direcionamento que possui um braço de homologia abaixo que inclui um locus de ADAM6 de camundongo ou fragmento funcional deste, ou para substituir um locus de ADAM6 de camundongo danificado com uma sequência ectópica posicionada entre dois segmentos gênicos V_L humanos ou entre os segmentos gênicos V_L humanos e um segmento gênico D_H (seja ele humano ou de camundongo, por exemplo, $V_\lambda + m/hD_H$), ou um segmento gênico J (sejam eles humanos ou de camundongo, por exemplo, $V_K + J_H$). Em uma modalidade, a substituição inclui dois ou mais segmentos gênicos V_L humanos, e o locus de ADAM6 de camundongo ou fragmento funcional deste está presente entre os dois segmentos gênicos V_L mais 3'. Em uma modalidade específica, o arranjo de segmentos gênicos V_L humanos é então o seguinte (de cima para baixo com relação à direção de transcrição dos segmentos gênicos humanos): $V_L 3' - 1$ humana - locus de ADAM6 de camundongo - $V_L 3'$ humana. Em uma modalidade, a orientação de um ou mais de ADAM6a de camundongo e ADAM6b de camundongo do locus de ADAM6 de camundongo é oposta com relação à direção de transcrição, comparada com a orientação dos segmentos gênicos V_L humanos. Alternativamente, o locus de ADAM6 de camundongo

está presente na região intergênica entre o segmento gênico V_L humano mais 3' e o segmento gênico D_H mais 5'. Esse pode ser o caso se o segmento D_H mais 5' é de camundongo ou humano.

[00257] Em um aspecto, é fornecido um camundongo com uma substituição de um ou mais segmentos gênicos VH endógenos de camundongo, e que compreende pelo menos um segmento gênico DH endógeno de camundongo. Em um camundongo desse tipo, a modificação dos segmentos gênicos VH endógenos de camundongo pode compreender uma modificação de um ou mais dos segmentos gênicos VH mais 3', mas não o segmento gênico DH mais 5', quando se deve ter cuidado para que a modificação de um ou mais dos segmentos gênicos VH mais 3' não rompa ou torne o locus endógeno de ADAM6 de camundongo não funcional. Por exemplo, em uma modalidade, o camundongo compreende uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos VH endógenos de camundongo com um ou mais segmentos gênicos VH humanos, e o camundongo compreende um ou mais segmentos gênicos DH endógenos e um locus endógeno funcional de ADAM6 de camundongo.

[00258] Em outra modalidade, o camundongo compreende a modificação dos segmentos gênicos VH endógenos de camundongo mais 3', e uma modificação de um ou mais segmentos gênicos DH endógenos de camundongo, e a modificação é realizada de modo a manter a integridade do locus endógeno de ADAM6 de camundongo para que o locus de ADAM6 endógeno permaneça funcional. Em um exemplo, uma modificação desse tipo é feita em duas etapas: (1) substituição dos segmentos gênicos VH endógenos de

camundongo mais 3' com um ou mais segmentos gênicos VH humanos com o emprego de um vetor de direcionamento com um braço de homologia acima e um braço de homologia abaixo, em que o braço de homologia abaixo inclui todo ou uma porção de um locus funcional de ADAM6 de camundongo; (2) a seguir, a substituição de um segmento gênico DH endógeno de camundongo com um vetor de direcionamento que possui um braço de homologia acima que inclui a todo ou uma porção funcional de um locus de ADAM6 de camundongo.

[00259] Em vários aspectos, o emprego de camundongos que contêm uma sequência ectópica que codifica uma proteína ADAM6 de camundongo, ou um ortólogo ou homólogo ou funcional homólogo desta, são úteis quando as modificações rompem a função de ADAM6 endógena de camundongo. A probabilidade de ruptura da função endógena de ADAM6 de camundongo é elevada quando se produzem modificações aos loci de imunoglobulina de camundongo, em particular quando se modifica as regiões variáveis da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo e sequências circundantes. Portanto, esses camundongos fornecem um benefício particular quando se produzem camundongos com loci da cadeia pesada de imunoglobulina que são deletados totalmente ou em parte, são totalmente humanizados ou em parte, ou são substituídos (por exemplo, com sequências Vk ou Vλ) totalmente ou em parte. Métodos para a produção das modificações genéticas descritas aos camundongos descritos abaixo são conhecidos por aqueles habilitados na técnica.

[00260] Camundongos que contêm uma sequência ectópica que codifica uma proteína ADAM6 de camundongo, ou uma proteína substancialmente idêntica ou similar que confere

os benefícios de fertilidade de uma proteína ADAM6 de camundongo, são particularmente úteis em conjunto com modificações a um locus do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo que rompem ou deletam a sequência de ADAM6 endógena de camundongo. Embora descritos primariamente em conexão com camundongos que expressam anticorpos com regiões variáveis humanas e regiões constantes de camundongo, esses camundongos são úteis em conexão com quaisquer modificações genéticas que rompam genes endógenos de ADAM6 de camundongo. Aqueles habilitados na técnica reconhecerão que isso engloba uma ampla variedade de camundongos geneticamente modificados que contêm modificações de loci do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo. Esses incluem, por exemplo, camundongos com uma deleção ou uma substituição de todos ou uma porção de segmentos do gene da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo, independentemente de outras modificações. Exemplos não limitantes são descritos abaixo.

[00261] Em alguns aspectos, são fornecidos camundongos geneticamente modificados que compreendem um gene de ADAM6 ectópico de camundongo, roedor, ou outro gene de ADAM6 (ou ortólogo ou homólogo ou fragmento) funcional em um camundongo, e um ou mais segmentos do gene da região variável e/ou constante de imunoglobulina humana. Em várias modalidades, outros ortólogos do gene de ADAM6, ou homólogos ou fragmentos, funcionais em um camundongo podem incluir sequências de sequências bovinas, caninas, de primatas, de coelho ou outras sequências não humanas.

[00262] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que

compreende uma sequência de ADAM6 ectópica que codifica uma proteína ADAM6 funcional, uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos VH de camundongo com um ou mais segmentos gênicos VH humanos; uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos DH de camundongo com um ou mais segmentos gênicos DH humanos; e uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos JH de camundongo com um ou mais segmentos gênicos JH humanos.

[00263] Em uma modalidade, o camundongo ainda compreende uma substituição de uma sequência de nucleotídeos de CH1 de camundongo com uma sequência de nucleotídeos de CH1 humana. Em uma modalidade, o camundongo ainda compreende uma substituição de uma sequência de nucleotídeos de dobradiça de camundongo com uma sequência de nucleotídeos de dobradiça humana. Em uma modalidade, o camundongo ainda compreende uma substituição de um locus variável da cadeia leve de imunoglobulina (V_L e J_L) com um locus variável da cadeia leve de imunoglobulina humana. Em uma modalidade, o camundongo ainda compreende uma substituição de uma sequência de nucleotídeos da região constante da cadeia leve de imunoglobulina de camundongo com a sequência de nucleotídeos da região constante da cadeia leve de imunoglobulina humana. Em uma modalidade específica, as V_L , J_L e C_L são sequências da cadeia leve κ de imunoglobulina. Em uma modalidade específica, o camundongo compreende uma sequência da região constante de imunoglobulina C_H2 de camundongo e C_H3 de camundongo fundida a uma sequência de dobradiça humana e de C_H1 humana, de modo que os loci de imunoglobulina de camundongo

se rearranjam para formar um gene que codifica uma proteína de ligação que compreende: (a) uma cadeia pesada que possui uma região variável humana, uma região C_H1 humana, uma região de dobradiça humana, e uma região C_H2 de camundongo e uma C_H3 de camundongo; e (b) um gene que codifica uma cadeia leve de imunoglobulina que compreende um domínio variável humano e uma região constante humana.

[00264] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que compreende uma sequência de ADAM6 ectópica que codifica uma proteína ADAM6 funcional, uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos VH de camundongo com um ou mais segmentos gênicos VL humanos e, opcionalmente, uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos DH e/ou segmentos gênicos JH com um ou mais segmentos gênicos DH humanos e/ou segmentos gênicos JH humanos ou, opcionalmente, uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos DH e segmentos gênicos JH com um ou mais segmentos gênicos JL humanos.

[00265] Em uma modalidade, o camundongo compreende uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos VH, DH e JH de camundongo com um ou mais segmentos gênicos VL, um ou mais segmentos gênicos DH e um ou mais segmentos gênicos J (por exemplo, J_k ou V_λ), em que os segmentos gênicos estão ligados operacionalmente a uma região de dobradiça de camundongo endógena, em que o camundongo forma a gene de cadeia de imunoglobulina rearranjado que contém, de 5' a 3' na direção de transcrição, VL humana - DH humana ou camundongo - J humana ou de camundongo - dobradiça de camundongo - CH2 de

camundongo - CH3 de camundongo. Em uma modalidade, a região J é uma Jk região humana. Em uma modalidade, a região J é uma região JH humana. Em uma modalidade, a região J é uma região Jk humana. Em uma modalidade, a região VL humana é selecionada de uma região Vλ humana e uma região Vk humana.

[00266] Em modalidades específicas, o camundongo expressa um anticorpo de domínio variável único que possui uma região constante de camundongo ou humana e uma região variável derivada de uma Vk humana, uma DH humana e a Jk humana; uma Vk humana, uma DH humana e uma JH humana; uma Vλ humana, uma DH humana e uma Jλ humana; uma Vλ humana, uma DH humana e uma JH humana; uma Vk humana, uma DH humana e uma JH humana; uma Vλ humana, uma DH humana e uma Jk humana. Em uma modalidade específica, sequências de reconhecimento de recombinação são modificadas de modo a permitir que ocorram rearranjos produtivos entre os segmentos gênicos V, D e J citados ou entre os segmentos gênicos V e J citados.

[00267] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que compreende uma sequência de ADAM6 ectópica que codifica uma proteína ADAM6 funcional (ou ortólogo ou homólogo ou fragmento funcional desta), uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos VH de camundongo com um ou mais segmentos gênicos VL humanos, uma substituição de todos ou substancialmente todo o segmento gênico DH de camundongo e segmentos gênicos JH com segmentos gênicos JL humanos; em que o camundongo não possui uma região CH1 e/ou de dobradiça.

[00268] Em uma modalidade, o camundongo é desprovido de uma sequência que codifica um domínio CH1. Em uma

modalidade, o camundongo é desprovido de uma sequência que codifica uma região de dobradiça. Em uma modalidade, o camundongo é desprovido de uma sequência que codifica um domínio CH1 e uma região de dobradiça.

[00269] Em uma modalidade específica, o camundongo expressa uma proteína de ligação que compreende um domínio variável da cadeia leve de imunoglobulina humana (λ ou κ) fundido a um domínio CH2 de camundongo que está anexado a um domínio CH3 de camundongo.

[00270] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que compreende uma sequência de ADAM6 ectópica que codifica uma proteína ADAM6 funcional (ou ortólogo ou homólogo ou fragmento funcional desta), uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos VH de camundongo com um ou mais segmentos gênicos VL humanos, uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos DH e segmentos gênicos JH de camundongo com segmentos gênicos JL humanos.

[00271] Em uma modalidade, o camundongo compreende uma deleção de uma sequência do gene região constante da cadeia pesada de imunoglobulina que codifica uma região de CH1, uma região de dobradiça, uma região de CH1 e uma de dobradiça, ou uma região de CH1 e uma região de dobradiça e uma região de CH2.

[00272] Em uma modalidade, o camundongo produz uma única proteína de ligação do domínio variável que compreende um homodímero selecionado dos seguintes: (a) VL humana - CH1 de camundongo - CH2 de camundongo - CH3 de camundongo; (b) VL humana - dobradiça de camundongo - CH2 de camundongo - CH3 de camundongo; (c) VL humana - CH2 de

camundongo - CH3 de camundongo.

[00273] Em um aspecto, é fornecido um camundongo com um locus endógeno desativado da cadeia pesada de imunoglobulina, que compreende um locus endógeno desativado ou deletado de ADAM6 de camundongo, em que o camundongo compreende uma sequência de ácido nucléico que expressa um anticorpo quimérico humano ou de camundongo ou humano/de camundongo ou outro anticorpo quimérico. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico está presente em um transgene integrado que é integrado aleatoriamente no genoma do camundongo. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucléico é em um epissomo (por exemplo, um cromossomo) não encontrado em um camundongo do tipo selvagem.

[00274] Em uma modalidade, o camundongo ainda compreende um locus endógeno desativado da cadeia leve de imunoglobulina. Em uma modalidade específica, o locus endógeno da cadeia leve de imunoglobulina é selecionado de um locus de cadeia leve kappa (κ) e um lambda (λ). Em uma modalidade específica, o camundongo compreende um locus endógeno desativado da cadeia leve κ e um locus desativado da cadeia leve λ , em que o camundongo expressa um anticorpo que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina humana e um domínio da cadeia leve de imunoglobulina humana. Em uma modalidade, o domínio da cadeia leve de imunoglobulina humana é selecionado de um domínio da cadeia leve κ humana e um domínio da cadeia leve λ humana.

[00275] Em um aspecto, é fornecido um animal geneticamente modificado que expressa um anticorpo quimérico e expressa uma proteína ADAM6 ou ortólogo ou

homólogo desta que é funcional no animal geneticamente modificado.

[00276] Em uma modalidade, o animal geneticamente modificado é selecionado de um camundongo e um rato. Em uma modalidade, o animal geneticamente modificado é um camundongo, e a proteína ADAM6 ou ortólogo ou homólogo desta é de uma cepa de camundongo que é uma cepa diferente do que o animal geneticamente modificado. Em uma modalidade, o animal geneticamente modificado é um roedor da família Cricetidae (por exemplo, um hamster, um rato do Novo Mundo ou camundongo, um arganaz), e a proteína ortólogo ou homólogo de ADAM6 é de um roedor da família Muridae (por exemplo, camundongo ou rato verdadeiro, ratos-do-deserto, rato-de-espinho, rato cristado). Em uma modalidade, o animal geneticamente modificado é um roedor da família Muridae, e o ortólogo ou homólogo da proteínas ADAM6 é de um roedor da família Cricetidae.

[00277] Em uma modalidade, o anticorpo quimérico compreende um domínio variável humano e uma sequência da região constante de um roedor. Em uma modalidade, o roedor é selecionado de um roedor da família Cricetidae e um roedor da família Muridae. Em uma modalidade específica, o roedor da família Cricetidae e da família Muridae é um camundongo. Em uma modalidade específica, o roedor da família Cricetidae e da família Muridae é um rato. Em uma modalidade, o anticorpo quimérico compreende um domínio variável humano e um domínio constante de um animal selecionado de um camundongo ou rato; em uma modalidade específica, o camundongo ou rato é selecionado da família Cricetidae e da família Muridae. Em uma modalidade, o

anticorpo quimérico compreende um domínio variável da cadeia pesada humana, um domínio variável da cadeia leve humana e uma sequência da região constante derivada de um roedor selecionado de camundongo e rato, em que o domínio variável da cadeia pesada humana e da cadeia leve humana são cognatos. Em uma modalidade específica, cognato inclui que os domínios variáveis da cadeia pesada humana e da cadeia leve humana são de uma única célula B que expressa o domínio variável da cadeia leve humana e o domínio variável da cadeia pesada humana juntos e apresentam os domínios variáveis juntos na superfície de uma célula B individual.

[00278] Em uma modalidade, o anticorpo quimérico é expresso por um locus de imunoglobulina. Em uma modalidade, o domínio variável da cadeia pesada do anticorpo quimérico é expresso por um locus rearranjado endógeno da cadeia pesada de imunoglobulina. Em uma modalidade, o domínio variável da cadeia leve do anticorpo quimérico é expresso por um locus rearranjado endógeno da cadeia leve de imunoglobulina. Em uma modalidade, o domínio variável da cadeia pesada do anticorpo quimérico e/ou o domínio variável da cadeia leve do anticorpo quimérico é expresso por um transgene rearranjado (por exemplo, uma sequência de ácido nucléico rearranjada derivada de uma sequência de ácido nucléico não rearranjada integrada no genoma do animal em um locus diferente de um locus endógeno de imunoglobulina). Em uma modalidade, o domínio variável da cadeia leve do anticorpo quimérico é expresso por um transgene rearranjado (por exemplo, uma sequência de ácido nucléico rearranjada derivada de uma sequência de ácido nucléico não rearranjada integrada no genoma do animal em

um locus diferente de um locus endógeno de imunoglobulina).

[00279] Em uma modalidade específica, o transgene é expresso por um locus transcricionalmente ativo, por exemplo, um locus ROSA26, por exemplo, um locus ROSA26 murídeo (por exemplo, camundongo).

[00280] Em um aspecto, é fornecido um animal não humano, que compreende um locus humanizado de cadeia pesada de imunoglobulina, em que o locus humanizado de cadeia pesada de imunoglobulina compreende uma sequência de ADAM6 não humana ou ortólogo ou homólogo desta.

[00281] Em uma modalidade, o animal não humano é um roedor selecionado de um camundongo, um rato e um hamster.

[00282] Em uma modalidade, o ortólogo ou homólogo de ADAM6 não humana é uma sequência que é ortóloga e/ou homóloga a uma sequência de ADAM6 de camundongo, em que o ortólogo ou homólogo é funcional no animal não humano.

[00283] Em uma modalidade, o animal não humano é selecionado de um camundongo, um rato e um hamster e o ortólogo ou homólogo de ADAM6 é de um animal não humano selecionado de um camundongo, um rato e um hamster. Em uma modalidade específica, o animal não humano é um camundongo e o ortólogo ou homólogo de ADAM6 é de um animal que é selecionado de uma espécie de camundongo diferente, um rato e um hamster. Em uma modalidade específica, o animal não humano é um rato e o ortólogo ou homólogo de ADAM6 é de um roedor que é selecionado de uma espécie de rato diferente, um camundongo e um hamster. Em uma modalidade específica, o animal não humano é um hamster, e o ortólogo ou homólogo de ADAM6 é de um roedor que é selecionado de uma espécie de hamster diferente, um camundongo e um rato.

[00284] Em uma modalidade específica, o animal não humano é da subordem Myomorpha, e a sequência de ADAM6 é de um animal selecionado de um roedor da superfamília Dipodoidea e um roedor da superfamília Muroidea. Em uma modalidade específica, o roedor é um camundongo da superfamília Muroidea, e o ortólogo ou homólogo de ADAM6 é de um camundongo ou um rato ou um hamster da superfamília Muroidea.

[00285] Em uma modalidade, o lócus humanizado de cadeia pesada compreende um ou mais segmentos gênicos VH humanos, um ou mais segmentos gênicos DH humanos e um ou mais segmentos gênicos JH humanos. Em uma modalidade específica, os (um ou mais) segmentos gênicos VH humanos, um ou mais segmentos gênicos DH humanos e um ou mais segmentos gênicos JH humanos estão ligados operacionalmente a um ou mais genes da região constante humanos, quiméricos e/ou de roedor (por exemplo, camundongo ou rato). Em uma modalidade, os genes da região constante são de camundongo. Em uma modalidade, os genes da região constante são de rato. Em uma modalidade, os genes da região constante são de hamster. Em uma modalidade, os genes da região constante compreendem uma sequência selecionada de uma dobradiça, uma CH2, uma CH3 e uma combinação destas. Em uma modalidade específica, os genes da região constante compreendem uma sequência de dobradiça, uma CH2 e uma CH3.

[00286] Em uma modalidade, a sequência de ADAM6 não humana é contígua com uma sequência da cadeia pesada de imunoglobulina humana. Em uma modalidade, a sequência de ADAM6 não humana está posicionada dentro de uma sequência da cadeia pesada de imunoglobulina humana. Em uma

modalidade específica, a sequência da cadeia pesada de imunoglobulina humana compreende um segmento gênico V, D e/ou J.

[00287] Em uma modalidade, a sequência de ADAM6 não humana está posicionada entre dois segmentos gênicos V. Em uma modalidade, a sequência de ADAM6 não humana está justaposta entre um segmento gênico V e um D. Em uma modalidade, a sequência de ADAM6 de camundongo está posicionada entre um segmento gênico V e um J. Em uma modalidade, a sequência de ADAM6 de camundongo está justaposta entre um segmento gênico D e um J.

[00288] Em um aspecto, é fornecido um animal não humano geneticamente modificado, que compreende uma célula B que expressa um domínio VH humano cognato com um domínio VL humano de um locus de imunoglobulina, em que o animal não humano expressa uma proteína não humana não imunoglobulina do locus de imunoglobulina. Em uma modalidade, a proteína não humana não imunoglobulina é uma proteína ADAM. Em uma modalidade específica, a proteína ADAM é uma proteína ADAM6 ou homólogo ou ortólogo ou fragmento funcional desta.

[00289] Em uma modalidade o animal não humano é um roedor (por exemplo, camundongo ou rato). Em uma modalidade, o roedor é da família Muridae. Em uma modalidade, o roedor é da subfamília Murinae. Em uma modalidade específica, o roedor da subfamília Murinae é selecionado de um camundongo e um rato.

[00290] Em uma modalidade, a proteína não humana não imunoglobulina é uma proteína de roedor. Em uma modalidade, o roedor é da família Muridae. Em uma modalidade, o roedor é da subfamília Murinae. Em uma modalidade específica, o

roedor é selecionado de um camundongo, um rato e um hamster.

[00291] Em uma modalidade, os domínios humanos VH e VL estão anexados diretamente ou por meio de um vinculador a uma sequência do domínio constante de imunoglobulina. Em uma modalidade específica, a sequência do domínio constante compreende uma sequência selecionada de uma dobradiça, uma CH2, uma CH3 e uma combinação destas. Em uma modalidade específica, o domínio VL humano é selecionado de um domínio V κ ou a V λ .

[00292] Em um aspecto, é fornecido um animal não humano geneticamente modificado, que compreende em sua linhagem germinativa uma sequência de imunoglobulina humana, em que o esperma de um animal não humano macho é caracterizado por um defeito de migração in vivo. Em uma modalidade, o defeito de migração in vivo compreende uma incapacidade do esperma do animal não humano macho para migrar de um útero através de um oviduto de a um animal não humano fêmea da mesma espécie. Em uma modalidade, o animal não humano não possui uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína ADAM6 ou fragmento funcional desta. Em uma modalidade específica, a proteína ADAM6 ou fragmento funcional desta inclui uma proteína ADAM6a e/ou uma proteína ADAM6b ou fragmentos funcionais destas. Em uma modalidade, o animal não humano é um roedor. Em uma modalidade específica, o roedor é selecionado de um camundongo, um rato e um hamster.

[00293] Em um aspecto, é fornecido um animal não humano que compreende uma sequência de imunoglobulina humana contígua com uma sequência não humana que codifica uma

proteína ADAM6 ou ortólogo ou homólogo ou fragmento funcional desta. Em uma modalidade, o animal não humano é um roedor. Em uma modalidade específica, o roedor é selecionado de um camundongo, um rato e um hamster.

[00294] Em uma modalidade, a sequência de imunoglobulina humana é uma sequência da cadeia pesada de imunoglobulina. Em uma modalidade, a sequência de imunoglobulina compreende um ou mais segmentos gênicos VH. Em uma modalidade, a sequência de imunoglobulina humana compreende um ou mais segmentos gênicos DH. Em uma modalidade, a sequência de imunoglobulina humana compreende um ou mais segmentos gênicos JH. Em uma modalidade, a sequência de imunoglobulina humana compreende um ou mais segmentos gênicos VH, um ou mais segmentos gênicos DH e um ou mais segmentos gênicos JH.

[00295] Em uma modalidade, a sequência de imunoglobulina compreende um ou mais segmentos gênicos VH que possuem uma frequência elevada em repertórios humanos naturais. Em uma modalidade específica, os (um ou mais) segmentos gênicos VH compreendem no máximo dois segmentos gênicos VH, no máximo três segmentos gênicos VH, no máximo quatro segmentos gênicos VH, no máximo cinco segmentos gênicos VH, no máximo seis segmentos gênicos VH, no máximo sete segmentos gênicos VH, no máximo oito segmentos gênicos VH, no máximo nove segmentos gênicos VH, no máximo 10 segmentos gênicos VH, no máximo 11 segmentos gênicos VH, no máximo 12 segmentos gênicos VH, no máximo 13 segmentos gênicos VH, no máximo 14 segmentos gênicos VH, no máximo 15 segmentos gênicos VH, no máximo 16, segmentos gênicos VH, no máximo 17 segmentos gênicos VH, no máximo 18 segmentos

gênicos VH, no máximo 19 segmentos gênicos VH, no máximo 20 segmentos gênicos VH, no máximo 21 segmentos gênicos VH, no máximo 22 segmentos gênicos VH ou no máximo 23 segmentos gênicos VH.

[00296] Em uma modalidade específica, os (um ou mais) segmentos gênicos VH compreendem cinco segmentos gênicos VH. Em uma modalidade específica, os (um ou mais) segmentos gênicos VH compreendem 10 segmentos gênicos VH. Em uma modalidade específica, os (um ou mais) segmentos gênicos VH compreendem 15 segmentos gênicos VH. Em uma modalidade específica, os (um ou mais) segmentos gênicos VH compreendem 20 segmentos gênicos VH.

[00297] Em várias modalidades, os segmentos gênicos VH são selecionados de VH6-1, VH1-2, VH1-3, VH2-5, VH3-7, VH1-8, VH3-9, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH1-18, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH1-24, VH2-26, VH4-28, VH3-30, VH4-31, VH3-33, VH4-34, VH3-35, VH3-38, VH4-39, VH3-43, VH1-45, VH1-46, VH3-48, VH3-49, VH5-51, VH3-53, VH1-58, VH4-59, VH4-61, VH3-64, VH3-66, VH1-69, VH2-70, VH3-72, VH3-73 e VH3-74.

[00298] Em várias modalidades, os segmentos gênicos VH são selecionados de VH1-2, VH1-8, VH1-18, VH1-46, VH1-69, VH3-7, VH3-9, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-43, VH3-48, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-59, VH5-51 e VH6-1.

[00299] Em várias modalidades, os segmentos gênicos VH são selecionados de VH1-18, VH1-46, VH1-69, VH3-7, VH3-11, VH3-15, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-48, VH4-34, VH4-39, VH4-59 e VH5-51.

[00300] Em várias modalidades, os segmentos gênicos VH

são selecionados de V_H1-18, V_H1-69, V_H3-7, V_H3-11, V_H3-15, V_H3-21, V_H3-23, V_H3-30, V_H3-43, V_H3-48, V_H4-39, V_H4-59 e V_H5-51.

[00301] Em várias modalidades, os segmentos gênicos VH são selecionados de VH1-18, VH3-11, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH4-39 e VH4-59.

[00302] Em várias modalidades, os segmentos gênicos VH são selecionados de VH1-18, VH3- 21, VH3-23, VH3-30 e VH4-39.

[00303] Em várias modalidades, os segmentos gênicos VH são selecionados de VH1-18, VH3-23 e VH4-39.

[00304] Em várias modalidades, os segmentos gênicos VH são selecionados de VH3-21, VH3-23 e VH3-30.

[00305] Em várias modalidades, os segmentos gênicos VH são selecionados de VH3-23, VH3-30 e VH4-39.

[00306] Em uma modalidade específica, a sequência de imunoglobulina humana compreende pelo menos 18 segmentos gênicos VH, 27 segmentos gênicos DH e seis segmentos gênicos JH. Em uma modalidade específica, a sequência de imunoglobulina humana compreende pelo menos 39 segmentos gênicos VH, 27 segmentos gênicos DH e seis segmentos gênicos JH. Em uma modalidade específica, a sequência de imunoglobulina humana compreende pelo menos 80 segmentos gênicos VH, 27 segmentos gênicos DH e seis segmentos gênicos JH.

[00307] Em uma modalidade, o animal não humano é um camundongo, e o camundongo compreende uma substituição de segmentos gênicos VH endógenos de camundongo com um ou mais segmentos gênicos VH humanos, em que os segmentos gênicos VH humanos estão ligados operacionalmente a um gene da

região CH de camundongo, de tal forma que o camundongo rearranja os segmentos gênicos VH humanos e expressa uma cadeia pesada quimérica reversa de imunoglobulina que compreende um domínio VH humano e um CH de camundongo. Em uma modalidade, 90-100% dos segmentos não rearranjados gênicos VH de camundongo are replaced com pelo menos one unarranged segmento gênico VH humano. Em uma modalidade específica, all ou substancialmente all of os segmentos gênicos VH endógenos de camundongo are replaced com pelo menos one unarranged segmento gênico VH humano. Em uma modalidade, a substituição é com pelo menos 19, pelo menos 39, ou pelo menos 80 ou 81 segmentos gênicos VH não rearranjados humanos. Em uma modalidade, a substituição é com pelo menos 12 segmentos gênicos VH funcionais não rearranjados humanos, pelo menos 25 segmentos gênicos VH funcionais não rearranjados humanos ou pelo menos 43 segmentos gênicos VH humanos funcionais não rearranjados. Em uma modalidade, o camundongo compreende uma substituição de todos os segmentos DH e JH de camundongo com pelo menos um segmento DH humano não rearranjado e pelo menos um segmento JH humano não rearranjado. Em uma modalidade, o (pelo menos um) segmento DH humano não rearranjado é selecionado 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, e uma combinação destes. Em uma modalidade, o (pelo menos um) segmento JH humano não rearranjado é selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, e uma combinação destes. Em uma modalidade específica, o (um ou mais) segmento gênico VH humano é selecionado de um segmento gênico VH 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 a 6-1, e uma combinação destes.

[00308] Em várias modalidades, a sequência de imunoglobulina humana está em ligação operacional com uma região constante na linhagem germinativa do animal não humano (por exemplo, o roedor, por exemplo, o camundongo, rato ou hamster). Em uma modalidade, a região constante é uma região constante humana, quimérica humana/de camundongo ou quimérica humana/de rato ou quimérica humana/hamster, de um camundongo, de um rato ou de um hamster. Em uma modalidade, a região constante é uma região constante de roedor (por exemplo, camundongo ou rato ou hamster). Em uma modalidade específica, o roedor é um camundongo ou rato. Em várias modalidades, a região constante compreende pelo menos um domínio C_H2 e um domínio C_H3.

[00309] Em uma modalidade, a sequência da cadeia pesada de imunoglobulina humana está localizada em um locus da cadeia pesada de imunoglobulina na linhagem germinativa do animal não humano (por exemplo, o roedor, por exemplo, o camundongo ou rato ou hamster). Em uma modalidade, a sequência da cadeia pesada de imunoglobulina humana está localizada em um locus da cadeia pesada de não imunoglobulina na linhagem germinativa do animal não humano, em que o locus não cadeia pesada é um locus transcricionalmente ativo. Em uma modalidade específica, o locus não cadeia pesada é um locus ROSA26.

[00310] Em vários aspectos, o animal não humano ainda compreende uma sequência da cadeia leve de imunoglobulina humana (por exemplo, uma ou mais sequências não rearranjadas V e J da cadeia leve, ou uma ou mais sequências VJ rearranjadas) na linhagem germinativa do

animal não humano. Em uma modalidade específica, a sequência da cadeia leve de imunoglobulina é uma sequência da cadeia leve κ de imunoglobulina. Em uma modalidade, a sequência da cadeia leve de imunoglobulina humana compreende um ou mais segmentos gênicos VL. Em uma modalidade, a sequência da cadeia leve de imunoglobulina humana compreende um ou mais segmentos gênicos JL. Em uma modalidade, a sequência da cadeia leve de imunoglobulina humana compreende um ou mais segmentos gênicos VL e um ou mais segmentos gênicos JL. Em uma modalidade específica, a sequência da cadeia leve de imunoglobulina humana compreende pelo menos 16 segmentos gênicos V κ e cinco segmentos gênicos J κ . Em uma modalidade específica, a sequência da cadeia leve de imunoglobulina humana compreende pelo menos 30 segmentos gênicos V κ e cinco segmentos gênicos J κ . Em uma modalidade específica, a sequência da cadeia leve de imunoglobulina humana compreende pelo menos 40 segmentos gênicos V κ e cinco segmentos gênicos J κ . Em várias modalidades, a sequência da cadeia leve de imunoglobulina humana está em ligação operacional com uma região constante na linhagem germinativa do animal não humano (por exemplo, roedor, por exemplo, camundongo ou rato ou hamster). Em uma modalidade, a região constante é uma região constante humana, quimérica humana/de roedor, de camundongo, de rato ou de hamster. Em uma modalidade específica, a região constante é uma região constante de camundongo ou rato. Em uma modalidade específica, a região constante é uma região constante κ de camundongo (mC κ) ou uma região constante κ de rato (rC κ).

[00311] Em uma modalidade, o animal não humano é um

camundongo e o camundongo compreende uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos Vk e Jk com pelo menos seis segmentos gênicos Vk humanos e pelo menos um segmento gênico Jk. Em uma modalidade, todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos Vk e Jk são substituídos com pelo menos 16 segmentos gênicos Vk humanos (Vk humana) e pelo menos um segmento gênico Jk. Em uma modalidade, todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos Vk e Jk são substituídos com pelo menos 30 segmentos gênicos Vk humanos e pelo menos um segmento gênico Jk. Em uma modalidade, todos ou substancialmente todos os segmentos gênicos Vk e Jk são substituídos com pelo menos 40 segmentos gênicos Vk humanos e pelo menos um segmento gênico Jk. Em uma modalidade, o (pelo menos um) segmento gênico Jk compreende dois, três, quatro ou cinco segmentos gênicos Jk humanos.

[00312] Em uma modalidade, os segmentos gênicos Vk humanos compreendem Vk4-1, Vk5-2, Vk7-3, Vk2-4, Vk1-5 e Vk1-6. Em uma modalidade, os segmentos gênicos Vk compreendem Vk3-7, Vk1-8, Vk1-9, Vk2-10, Vk3-11, Vk1-12, Vk1-13, Vk2-14, Vk3-15 e 1-16. Em uma modalidade, os segmentos gênicos Vk humanos compreendem Vk1-17, Vk2-18, Vk2-19, Vk3-20, Vk6-21, Vk1-22, Vk1-23, Vk2-24, Vk3-25, Vk2-26, Vk1-27, Vk2-28, Vk2-29 e Vk2-30. Em uma modalidade, os segmentos gênicos Vk humanos compreendem Vk3-31, Vk1-32, Vk1-33, Vk3-34, Vk1-35, Vk2-36, Vk1-37, Vk2-38, Vk1-39 e Vk2-40.

[00313] Em uma modalidade específica, os segmentos gênicos Vk compreendem segmentos gênicos κ de imunoglobulina humana contíguos que transpõem o lócus da

cadeia leve κ de imunoglobulina humana de Vk4-1 a Vk2-40, e os segmentos gênicos J κ compreendem segmentos gênicos contíguos que transpõem o locus da cadeia leve κ de imunoglobulina humana de J κ 1 a J κ 5.

[00314] Em uma modalidade, a sequência da cadeia leve de imunoglobulina humana está localizada em um locus de cadeia leve de imunoglobulina na linhagem germinativa do animal não humano. Em uma modalidade específica, o locus de cadeia leve de imunoglobulina na linhagem germinativa do animal não humano é um locus da cadeia leve κ de imunoglobulina. Em uma modalidade, a sequência da cadeia leve de imunoglobulina humana está localizada em um locus de cadeia leve de não imunoglobulina na linhagem germinativa do animal não humano que é transcricionalmente ativo. Em uma modalidade específica, o locus não-imunoglobulina é um locus ROSA26.

[00315] Em um aspecto, é fornecido um método de produção de um anticorpo humano, em que o anticorpo humano compreende domínios variáveis derivados de uma ou mais sequências de ácidos nucleicos da região variável codificadas em uma célula de um animal não humano como aqui descrito.

[00316] Em um aspecto, é fornecida uma composição farmacêutica que compreende um polipeptídeo que compreende anticorpo ou fragmento de anticorpo que é derivado de uma ou mais sequências de ácidos nucleicos da região variável isoladas de um animal não humano como aqui descrito. Em uma modalidade, o polipeptídeo é um anticorpo. Em uma modalidade, o polipeptídeo é uma anticorpo somente de cadeia pesada. Em uma modalidade, o polipeptídeo é um

fragmento variável de única cadeia (por exemplo, um scFv).

[00317] Em um aspecto, é fornecido uso de um animal não humano como aqui descrito para produzir um anticorpo. Em várias modalidades, o anticorpo compreende um ou mais domínios variáveis que são derivados de uma ou mais sequências de ácidos nucleicos da região variável isoladas do animal não humano. Em uma modalidade específica, as sequências de ácidos nucleicos da região variável compreendem segmentos do gene da cadeia pesada de imunoglobulina. Em uma modalidade específica, as sequências de ácidos nucleicos da região variável compreendem segmentos gênicos da cadeia leve de imunoglobulina.

EXEMPLOS

[00318] Os exemplos seguintes são fornecidos de modo a descrever como produzir e usar os métodos e composições da invenção, e não visam limitar o escopo do que os inventores consideram como sua invenção. A menos que indicado de forma diferente, a temperatura é indicada em graus Celsius e a pressão está na pressão atmosférica ou próxima a ela.

Exemplo 1

Humanização de gene de imunoglobulina de camundongos

[00319] Cromossomos bacterianos artificiais (BACs) humanos e de camundongo foram usados para criar geneticamente 13 vetores de direcionamento de BAC (BACvecs) diferentes para humanização dos loci da cadeia pesada e da cadeia leve κ de imunoglobulina de camundongo. As Tabelas 1 e 2 apresentam descrições das etapas realizadas para construção de todos os BACvecs empregados para a humanização de loci da cadeia pesada e da cadeia leve κ de imunoglobulina de camundongo, respectivamente.

[00320] Identificação de BACs humanos e de camundongo.

BACs de camundongo que transpõem as extremidades 5' e 3' dos loci da cadeia pesada e da cadeia leve κ de imunoglobulina foram identificados por hibridização de filtros pontuados com biblioteca de BAC ou por avaliação por PCR de pools de DNA de biblioteca de BAC de camundongo. Os filtros foram hibridizados sob condições-padrão usando sondas que correspondiam às regiões de interesse. Os pools da biblioteca foram avaliados por PCR usando pares de iniciadores exclusivos que flanqueiam a região de interesse visada. PCR adicional usando os mesmos iniciadores foi realizada para desenrolar certo poço e isolar o BAC de interesse correspondente. Tanto filtros de BAC quanto pools de biblioteca foram gerados por células de camundongo ES 129 SvJ (Incyte Genomics/Invitrogen). BACs humanos que cobrem todos os loci da cadeia pesada e da cadeia leve κ de imunoglobulina foram identificados por hibridização de filtros pontuados com biblioteca de BAC (bibliotecas Caltech B, C ou D e biblioteca RPCI-11, Research Genetics/Invitrogen) por meio de avaliação de pools da biblioteca de BAC humano (Caltech biblioteca, Invitrogen) por um método à base de PCR ou por utilização de uma base de dados de sequência final de BAC (biblioteca Caltech D, TIGR).

[00321] Construção de BACvecs por recombinação homóloga bacteriana e ligação. A recombinação homóloga bacteriana (BHR) foi realizada como descrito (Valenzuela e cols., 2003; Zhang e cols., 1998, "A New Logic for DNA Engineering Using Recombination in *Escherichia coli*", *Nat. Genet.* 20: 123-128). Na maioria dos casos, fragmentos lineares foram

gerados por ligação de caixas de homologia geradas por PCR aos cassetes clonados, seguida por isolamento em gel de produtos de ligação e eletroporação em bactérias BHR-competentes que abrigam o BAC-alvo. Após seleção em placas de Petri com o antibiótico apropriado, BACs corretamente recombinados foram identificados por PCR tanto através de novas junções seguida por análise de restrição em géis de campo pulsado (Schwartz e Cantor, 1984, "Separation of Yeast Chromosome-Sized Dnas by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis", *Cell* 37: 67-75) quanto por verificação de pontos por PCR usando iniciadores distribuídos através das sequências humanas.

[00322] Um 3hV_H BACvec foi construído usando três etapas de BHR sequenciais para a etapa inicial de humanização do locus da cadeia pesada de imunoglobulina (FIG. 4A e Tabela 1). Na primeira etapa (Etapa 1), um cassete foi introduzido em um BAC humano parental acima do segmento gênico VH₁₋₃ humano que contém uma região de homologia para o locus da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo (HB1), um gene que confere resistência à canamicina em bactérias e resistência a G418 em células de animais (kanR) e um sítio de recombinação sítio-específico (por exemplo, loxP). Na segunda etapa (Etapa 2), um segundo cassete foi introduzido imediatamente abaixo do último segmento J_H que contém uma segunda região de homologia para o locus da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo (HB2) e um gene que confere resistência em bactérias à espectinomicina (specR). Essa segunda etapa incluiu a deleção de locus das sequências da cadeia pesada de imunoglobulina humana abaixo de J_H6 e o gene de resistência

ao cloranfenicol do vetor BAC (cmR). Na terceira etapa (Etapa 3), o BAC humano duplamente modificado (B1) foi então linearizado usando sítios I-CeuI que foram adicionados durante as primeiras duas etapas e integrados em um BAC de camundongo (B2) por BHR por meio das duas regiões de homologia (HB1 e HB2). As seleções de fármaco para a primeira (cm/kan), segunda (spec/kan) e terceira (cm/kan) etapas foram projetadas para serem específicas para os produtos desejados. clones de BAC modificados foram analisados por eletroforese em gel *pulse-filed* (PFGE) após digestão com enzimas de restrição para determinar a construção apropriada (FIG. 4B).

[00323] De forma similar, 12 BACvecs adicionais foram criados geneticamente para humanização dos loci da cadeia pesada e da cadeia leve κ . Em alguns casos, foi realizada a ligação de BAC no lugar de BHR para unir dois BACs grandes por meio da introdução de sítios de restrição raros em ambos os BACvecs parentais por BHR, juntamente com colocação cuidadosa de marcadores selecionáveis. Isso permitiu a sobrevivência do produto de ligação desejado mediante seleção com combinações específicas de marcador farmacológico. Os BACs recombinantes obtidos por ligação após digestão com enzimas de restrição raras foram identificados e avaliados de forma similar com aqueles obtidos por BHR (como descrito acima).

Tabela 1

BACvec	Etapa	Descrição	Processo
3hV _H	1	Inserir caixa de homologia de camundongo acima no BAC humano proximal CTD-2572o2	BHR

	2	Inserir caixa de homologia de camundongo abaixo no BAC humano proximal CTD-2572o2	BHR
	3	Inserir 3hV _H /27hD _H /9hJ _H no BAC de camundongo proximal CT7302a07 para criar 3hV _H BACvec	BHR
DC	1	Inserir cassete na extremidade distal de locus de IgH de camundongo usando BAC de camundongo CT7-253i20	BHR
18hV _H	1	Inserir marcador de specR na extremidade inferior da inserção de 3hV _H usando BAC humano CTD-2572o2	BHR
	2	Inserir sítios I-CeuI e Not que flanqueiam puroR na extremidade superior da inserção de 3hV _H	BHR
	3	Inserir sítio Not na extremidade inferior do BAC Re12-408p02 (aproximadamente 10 kb abaixo de VH ₂ -5)	BHR
	4	Inserir sítio I-CeuI na extremidade superior do BAC Re12-408p02 (aproximadamente 23 kb acima de VH ₁ -18)	BHR
	5	Ligar fragmento de 184 kb da etapa 4 no vetor de 153 kb da etapa 2	Ligação
	6	Remover homologia humana de BAC CTD-2572o2 por deleção de aproximadamente 85 kb e deixando homologia de 65 kb para 3hV _H	BHR
	7	Inserir cassete e sítio Not na	BHR

		extremidade distal de lócus de IgH de camundongo no BAC CT7-253i20	
	8	Subclonar o braço de homologia distal de camundongo para inserção acima de BACs humanos	Ligação
	9	Inserir braço de camundongo de 20 kb acima de Rel2-408p02	BHR
	10	Mudar o cassete de seleção de hygR para neoR para criar 18hV _H BACvec	BHR
39hV _H	1	Inserir sítios I-CeuI e PI-SceI que flanqueiam hygR na extremidade distal de BAC humano CTD-2534n10	BHR
	2	Inserir CmR na extremidade proximal de BAC CTD-2534n10 para permitir a seleção para ligação ao BAC RP11-72n10	BHR
	3	Inserir sítio PI-SceI no BAC RP11-72n10 para ligação ao BAC CTD-2534n10	BHR
	4	Inserir sítios I-CeuI e AscI que flanqueiam puroR na extremidade distal de BAC RP11-72n10	BHR
	5	Ligar fragmento de 161 kb da construção da etapa 4 na construção da etapa 2 substituindo hygR	Ligação
	6	Inserir neoR e sítio AscI na extremidade proximal do braço de homologia distal de camundongo usando BAC CT7-253i20	BHR
	7	Inserir specR e sítio I-CeuI na	BHR

		extremidade distal do braço de homologia distal de camundongo	
	8	Ligar o braço de homologia distal de camundongo no inserto humano da etapa 5	Ligação
	9	Mudar o cassete de seleção de neo para hyg usando UbCp e pA como caixas de homologia para criar 39hV _H BACvec	BHR
53hV _H	1	Inserir specR na extremidade proximal do BAC humano CTD-3074b5	BHR
	2	Inserir sítio AscI na extremidade distal de BAC humano CTD-3074b5	BHR
	3	Inserir hygR e sítio AscI na extremidade proximal do braço de homologia distal de camundongo usando BAC CT7-253i20	BHR
	4	Ligar o braço de homologia distal de camundongo na construção da etapa 2	Ligação
	5	Mudar o cassete de seleção de hyg para neo usando UbCp e pA como caixas de homologia para criar 53hV _H BACvec	BHR
70hV _H	1	Inserir sítios PI-SceI e I-CeuI que flanqueiam spec na extremidade distal do BAC humano CTD-2195p5	BHR
	2	Inserir o sítio I-CeuI na extremidade proximal do BAC RP11-926p12 para ligação ao BAC CTD-2195p5	BHR

	3	Inserir sítios I-CeuI e AscI na extremidade distal do BAC RP11-926p12 para ligação do braço de camundongo	BHR
	4	Ligar o braço de homologia distal de camundongo na construção da etapa 3	Ligação
	5	Ligar o braço de homologia distal de camundongo e fragmento hIgH de BAC RP11-926p12 no BAC CTD-2195p5 para criar 70 hV _H BACvec	Ligação
80hV _H	1	Inserir sítios I-CeuI e AscI que flanqueiam hygR na extremidade distal do BAC CTD-2313e3	BHR
	2	Ligar o braço de homologia distal de camundongo no BAC humano CTD-2313e3 da etapa 1 para criar 80hV _H BACvec	Ligação

Tabela 2

BACvec	Etapa	Descrição	Processo
Igk-PC	1	Inserir sítio loxP dentro do íntron J-C de camundongo usando BAC CT7-254m04	BHR
Igk-DC	1	Inserir sítio loxP na extremidade distal do locus de Igk de camundongo usando BAC CT7-302g12	BHR
6hV _K	1	Inserir sítio PI-SceI aproximadamente 400 bp abaixo de hJ _K 5 no BAC CTD-2366j12	BHR
	2	Inserir sítios I-CeuI e AscI que flanqueiam hygR na extremidade distal de BAC CTD-2366j12	BHR

	3	Inserir sítios I-CeuI e PI-SceI que flanqueiam puroR abaixo de mJk usando BAC CT7-254m04	BHR
	4	Inserir hIgV _k /J _k acima de Enh _k /C _k de camundongo usando a construção da etapa 3	Ligação
	5	Substituir cmR na construção da etapa 4 com specR	BHR
	6	Inserir cassete de seleção Neo na extremidade distal de camundongo locus de Igk usando BAC CT7-302g12	BHR
	7	Ligar o braço de homologia distal de camundongo acima do inserto humano na construção da etapa 6 para criar 6hVk BACvec	Ligação
16hVk	1	Inserir NeoR na extremidade distal de BAC RP11-1061b13	BHR
	2	Substituir cmR na construção da etapa 1 com specR	BHR
	3	Inserir cassete de seleção Hyg na extremidade distal de camundongo locus de Igk usando BAC CT7-302g12	BHR
	4	Ligar o braço de homologia distal de camundongo acima do inserto humano da construção da etapa 2 para criar 16hVk BACvec	Ligação
30hVk	1	Inserir HygR na extremidade distal de BAC RP11-99g6	BHR
	2	Substituir cmR na construção da	BHR

		etapa 1 com specR	
	3	Inserir cassete de seleção Neo na extremidade distal do locus de Igk de camundongo usando BAC CT7-302g12	BHR
	4	Ligar o braço de homologia distal de camundongo acima do inserto humano da construção da etapa 2 para criar 30hVk BACvec	Ligação
40hVk	1	Inserir NeoR na extremidade distal de locus de hIgH no BAC CTD-2559d6	BHR
	2	Substituir cmR na construção da etapa 1 com specR	BHR
	3	Ligar o braço de homologia distal de camundongo acima do inserto humano na construção da etapa 2 para criar 40hVk BACvec	Ligação

[00324] Modificação de células-tronco embrionárias (ES) e geração de camundongos. O direcionamento de célula ES (F1H4) foi realizado usando o método de engenharia genética VELOCIGENE® como descrito (Valenzuela e cols., 2003). A derivação de camundongos de células ES modificadas por blastocisto (Valenzuela e cols., 2003) ou injeção de 8 células (Poueymirou e cols., 2007, "F0 Generation Mice Fully Derived From Gene-Targeted Embryonic Stem Cells Allowing Immediate Phenotypic Analyses", *Nat. Biotechnol.* 25: 91-99) foi como descrita. Células ES direcionadas e camundongos foram confirmados por avaliação de DNA de células ES ou camundongos com conjuntos exclusivos de sondas e iniciadores em um ensaio baseado em PCR (por exemplo, FIGS. 3A, 3B e 3C). Todos os estudos em camundongo

foram inspecionados e aprovados por "Regeneron's Institutional Animal Care and Use Committee" (IACUC).

[00325] Análise de cariótipo e hibridização fluorescente *in situ* (FISH). A análise de cariótipo foi realizada por "Coriell Cell Repositories" ("Coriell Institute for Medical Research", Camden, NJ). FISH foi realizada em células ES direcionadas como descrito (Valenzuela e cols., 2003). Sondas que correspondem ao DNA de BAC de camundongo ou DNA de BAC humano foram marcadas por *nick translation* (Invitrogen) com o espectro laranja ou espectro verde de nucleotídeos dUTP marcados de forma fluorescente (Vysis).

[00326] Lócus do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina. A humanização do lócus da região variável da cadeia pesada foi obtida em nove etapas sequenciais pela substituição direta de cerca de três milhões de pares de bases (Mb) de sequência genômica de camundongo contígua contendo todos os segmentos gênicos V_H , D_H e J_H com cerca de um Mb de sequência genômica humana contígua contendo os segmentos gênicos humanos equivalentes (FIG. 1A e Tabela 1) usando a tecnologia de engenharia genética VELOCIGENE® (veja, por exemplo, a Patente U.S. N° 6.586.251 e Valenzuela e cols., 2003).

[00327] O íntron entre os segmentos gênicos J_H e os genes da região constante (o íntron J-C) contém um intensificador transcricional (Neuberger, 1983, "Expression and Regulation of Immunoglobulin Heavy Chain Gene Transfected Into Lymphoid Cells", *EMBO J.* 2: 1.373-1.378), seguida por uma região de repetições simples necessária à recombinação durante mudança de isótipo (Kataoka e cols.,

1980, "Rearrangement of Immunoglobulin Gamma 1-Chain Gene and Mechanism For Heavy-Chain Class Switch", *PNAS USA* 77: 919-923). A junção entre a região V_H - D_H - J_H humana e a região C_H de camundongo (a junção proximal) foi escolhida para manter o intensificador intrônico da cadeia pesada de camundongo e o domínio de mudança a fim de preservar tanto a expressão eficiente quanto a mudança de classe do locus humanizado da cadeia pesada dentro do camundongo. A posição de nucleotídeo exata dessa e de junções subsequentes em todas as substituições foi possível pelo uso do método de engenharia genética VELOCIGENE® (*supra*), que empregou recombinação homóloga bacteriana dirigida por oligonucleotídeos sintetizados. Dessa forma, a junção proximal foi colocada cerca de 200 bp abaixo do último segmento gênico J_H e a junção distal foi colocada várias centenas de kb acima do segmento gênico V_H mais 5' do locus humano e cerca de 9 kb abaixo do segmento gênico V_{H1-86} de camundongo, também conhecido como J558.55. O segmento gênico V_{H1-86} (J558.55) de camundongo é o segmento gênico variável da cadeia pesada mais distal, supostamente um pseudogene em camundongos C57BL/6, mas potencialmente ativo, embora com uma sequência RSS pobre, no alelo 129 visado. A extremidade distal do locus da cadeia pesada de camundongo supostamente pode conter elementos de controle que regulam a expressão e/ou rearranjo do locus (Pawliitzky e cols., 2006).

[00328] Uma primeira inserção de sequência de DNA de imunoglobulina humana no camundongo foi obtida usando 144 kb da extremidade proximal do locus da cadeia pesada humana contendo 3 segmentos gênicos V_H , todos os segmentos gênicos

27 DH e 9 segmentos gênicos JH humanos inseridos na extremidade proximal do locus de IgH de camundongo, com uma deleção de 16,6 kb concomitante de sequência genômica de camundongo, usando cerca de 75 kb de braços de homologia de camundongo (Etapa A, FIG. 2A; Tabelas 1 e 3, 3hVH). Essa inserção grande de 144 kb e a deleção de 16,6 kb que a acompanha foi realizada em uma etapa única (Etapa A) que ocorreu com uma frequência de 0,2% (Tabela 3). As células ES corretamente direcionadas foram classificadas por um ensaio loss-of-native-allele (LONA) (Valenzuela e cols., 2003) usando sondas dentro e que flanqueiam a sequência de camundongo deletada e dentro da sequência humana inserida, e a integridade do grande inserto humano foi verificada usando múltiplas sondas que transpõem toda a inserção (FIG. 3A, 3B e 3C). Como eram previstas muitas rodadas de direcionamento sequencial de células ES, os clones de células ES direcionadas nessa etapa, e em todas as etapas subsequentes, foram submetidos à análise de cariótipo (supra), e apenas aqueles clones que mostram cariótipos normais em pelo menos 17 de 20 esfregaços foram utilizados para etapas subsequentes.

[00329] As células ES direcionadas da Etapa A foram redirecionadas com um BACvec que produziu uma deleção de 19 kb na extremidade distal do locus da cadeia pesada (Etapa B, FIG. 2A). O BACvec da Etapa B continha um gene de resistência à higromicina (hyg) em contraste com o gene de resistência à neomicina (neo) contido no BACvec da Etapa A. Os genes de resistência dos dois BACvecs foram projetados de tal forma que, mediante direcionamento bem sucedido ao mesmo cromossomo, aproximadamente três Mb do locus do gene

variável da cadeia pesada de camundongo contendo todos os segmentos gênicos VH de camundongo diferentes de VH1-86 e todos os segmentos gênicos DH diferentes de DQ52, bem como os dois genes de resistência, eram flanqueados por sítios loxP; DQ52 e todos os segmentos gênicos da cadeia JH de camundongo foram deletados na Etapa A. Clones de células ES duplamente direcionados ao mesmo cromossomo foram identificados por direcionamento do cassete proximal 3hVH à homozigose em G418 elevado (Mortensen e cols., 1992, "Production of Homozygous Mutant ES Cells with a Single Targeting Construct", Mol. Cell. Biol. 12: 2.391-2.395) e seguindo o destino do cassete de hyg distal. Segmentos de camundongo com tamanho de até quatro Mb, que foram modificados de forma a serem flanqueados por sítios loxP, foram deletados com sucesso em células ES por expressão transitória de CRE recombinase com eficiências elevadas (até aproximadamente 11 %), até mesmo na ausência de seleção farmacológica (Zheng e cols., 2000, "Engineering Mouse Chromosomes with Cre-Loxp: Range, Efficiency, and Somatic Applications", Mol. Cell. Biol. 20: 648-655). De forma similar, os inventores obtiveram uma deleção de três Mb em 8% dos clones de células ES após expressão transitória de CRE (Etapa C, FIG. 2A; Tabela 3). A deleção foi classificada pelo ensaio LONA usando sondas na extremidade da sequência de camundongo deletada, bem como pela perda de neo e hyg e pelo surgimento de um produto de PCR através do ponto de deleção que contém o único sítio loxP restante. Além disso, a deleção foi confirmada por hibridização por fluorescência in situ (dados não mostrados).

[00330] O restante da região variável da cadeia pesada humana foi adicionado ao alelo 3hVH em uma série de 5 etapas usando o método de engenharia genética VELOCIGENE® (Etapas E-H, FIG. 2B), com cada etapa envolvendo a inserção precisa de até 210 kb de sequências gênicas humanas. Para cada etapa, a extremidade proximal de cada novo BACvec era projetada para se sobrepor às sequências humanas mais distais da etapa prévia, e a extremidade distal de cada novo BACvec continha a mesma região distal de homologia de camundongo usada na Etapa A. Os BACvecs das etapas D, F e H continham cassetes de seleção neo, enquanto aqueles das etapas E e G continham cassetes de seleção hyg e, dessa forma, as seleções foram alternadas entre G418 e higromicina. O direcionamento na Etapa D foi testado pela perda do produto de PCR único através do sítio loxP distal do alelo híbrido 3hVH. O direcionamento para as Etapas E a I foi testado pela perda do cassete de seleção prévio. Na etapa final (Etapa I, FIG. 2B), o cassete de seleção neo, flanqueado por sítios Frt (McLeod e cols., 1986, "Identification of The Crossover Site During FLP-Mediated Recombination in the *Saccharomyces Cerevisiae* Plasmid 2 Microns Circle", *Mol. Cell. Biol.* 6: 3.357-3.367), foi removido por expressão transitória de FLPe (Buchholz e cols., 1998, "Improved Properties of FLP Recombinase Evolved by Cycling Mutagenesis", *Nat. Biotechnol.* 16: 657-662). As sequências humanas dos BACvecs para as Etapas D, E e G foram derivadas de dois BACs humanos parentais cada, enquanto aquelas das Etapas F e H eram de BACs únicos. A retenção de sequências humanas foi confirmada em todas as etapas usando múltiplas sondas que transpõem as sequências

humanas inseridas (como descrito acima, por exemplo, FIG. 3A, 3B e 3C). Somente aqueles clones com cariótipo normal e linhagem germinativa potencial foram levados adiante em cada etapa. Células ES da etapa final ainda eram capazes de contribuir para a linhagem germinativa após nove manipulações sequenciais (Tabela 3). Camundongos homozigotos para cada um dos alelos da cadeia pesada eram viáveis, pareciam saudáveis e demonstraram um sistema imune humoral essencialmente do tipo selvagem (veja o Exemplo 3).

Tabela 3

Alelo híbrido	Sequência humana	Construção de direcionamento	Eficiência de direcionamento	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

[00331] Lócus do gene variável da cadeia leve κ de imunoglobulina. A região variável da cadeia leve κ foi humanizada em oito etapas sequenciais pela substituição direta de cerca de três Mb de sequência de camundongo contendo todos os segmentos gênicos V _{κ} e J _{κ} com cerca de 0,5 Mb de sequência humana contendo os segmentos gênicos V _{κ} e J _{κ} humanos proximais de forma similar àquela da cadeia pesada (FIG. 1B; Tabelas 2 e 4).

[00332] A região variável do lócus da cadeia leve κ humana contém duas repetições de 400 kb quase idênticas

separadas por um espaçador de 800 kb (Weichhold e cols., 1993, "The Human Immunoglobulin Kappa Locus Consists of Two Copies that Are Organized In Opposite Polarity", *Genomics* 16: 503-511). Como as repetições eram muito similares, quase todo o locus diversidade pode ser reproduzido em camundongos por utilização da repetição proximal. Além disso, foi relatado um alelo humano natural do locus da cadeia leve κ sem a repetição distal (Schaible e cols., 1993, "The Immunoglobulin Lappa Locus: Polymorphism and Haplotypes of Caucasoid and non-Caucasoid Individuals, *Hum. Genet.* 91: 261-267). Os inventores substituíram cerca de três Mb de sequência gênica variável da cadeia leve κ de camundongo com cerca de 0,5 Mb de sequência gênica variável da cadeia leve κ humana para substituir eficazmente todos os segmentos gênicos V_{κ} e J_{κ} de camundongo com a V_{κ} humana proximal e todos os segmentos gênicos J_{κ} humanos (FIG. 2C e 2D; Tabelas 2 e 4). Em contraste com o método descrito no Exemplo 1 para o locus da cadeia pesada, toda a região do gene V_{κ} de camundongo, que contém todos os segmentos gênicos V_{κ} e J_{κ} , foi deletada em um processo em três etapas antes da adição de qualquer sequência humana. Primeiro, um cassete neo foi introduzido na extremidade proximal da região variável (Etapa A, FIG. 2C). A seguir, um cassete hyg foi inserido na extremidade distal do locus κ (Etapa B, FIG. 2C). Sítios de reconhecimento de recombinase (por exemplo, loxP) foram novamente situados dentro de cada cassete de seleção, de tal forma que o tratamento com CRE induzisse deleção dos 3 Mb restantes da região V_{κ} de camundongo, juntamente com ambos os genes de resistência (Etapa C, FIG. 2C).

[00333] Um fragmento genômico humano de cerca de 480 kb de tamanho contendo toda a região variável da cadeia leve κ de imunoglobulina foi inserido em quatro etapas sequenciais (FIG. 2D; Tabelas 2 e 4), com até 150 kb de sequência da cadeia leve κ de imunoglobulina humana inseridos em uma etapa única, usando métodos similares àqueles empregados para a cadeia pesada (veja o Exemplo 1). O gene de resistência à higromicina final foi removido por expressão transitória de FLPe. Como feito com a cadeia pesada, os clones de células ES direcionadas foram avaliados quanto à integridade de todo o inserto humano, cariótipo normal e linhagem germinativa potencial após todas as etapas. Camundongos homozigotos para cada um dos alelos da cadeia leve κ foram gerados e foi constatado que eram saudáveis e de aparência normal.

Tabela 4

Alelo híbrido	Sequência humana	Construção de direcionamento	Eficiência de direcionamento	Uso %	Vκ total	Vκ funcional
Ig κ -PC	0	132 kb	1,1%	-	-	-
Ig κ -PC/DC	0	90 kb	0,4%	-	-	-
Ig κ -CRE	0	-	1%	-	-	-
6hV κ	110 kb	122 kb	0.3%	14	6	4
16hV κ	240 kb	203 kb	0,4%	47	16	11
30hV κ	390 kb	193 kb	0,1%	70	30	18
40hV κ	480 kb	185 kb	0,2%	100	40	25
40hV κ dHyg	480 kb	-	0.7%	100	40	25

Exemplo 2

Geração de Camundongos totalmente humanizados por combinação de múltiplos alelos de imunoglobulina humanizados

[00334] Em vários pontos, células ES que abrigam uma porção dos repertórios variáveis de cadeia pesada ou cadeia leve κ de imunoglobulina humana, como descrito no Exemplo 1, foram microinjetadas, e os camundongos resultantes cruzados para criar múltiplas versões de camundongos VELOCIMMUNE® com frações progressivamente maiores dos repertórios de imunoglobulina da linhagem germinativa humana (Tabela 5; FIG. 5A e 5B). Os camundongos VELOCIMMUNE® 1 (V1) possuem dezoito segmentos gênicos V_H humanos e todos os segmentos gênicos D_H e J_H humanos combinados com dezesseis segmentos gênicos V_κ humanos e todos os segmentos gênicos J_κ humanos. Camundongos VELOCIMMUNE® 2 (V2) e VELOCIMMUNE® (V3) possuem repertórios variáveis aumentados que abrigam um total de trinta e nove segmentos V_H e trinta V_κ e noventa V_H e quarenta V_κ , respectivamente. Como as regiões genômicas que codificam os segmentos gênicos V_H , D_H e J_H de camundongo, e os segmentos gênicos V_κ e J_κ , foram completamente substituídas, anticorpos produzidos por todas as versões de camundongos VELOCIMMUNE® contêm regiões variáveis humanas ligadas a regiões constantes de camundongo. Os loci da cadeia leve λ de camundongo permanecem intactos em várias modalidades dos camundongos VELOCIMMUNE® e servem como um comparador para a eficiência de expressão dos vários loci da cadeia leve κ de VELOCIMMUNE®.

[00335] Camundongos duplamente homozigotos para humanizações tanto da cadeia pesada quanto da cadeia leve κ de imunoglobulina foram gerados por um subconjunto dos alelos descritos no Exemplo 1. Todos os genótipos observados durante a evolução da procriação para gerar os

camundongos duplamente homozigotos ocorreram em proporções aproximadamente mendelianas. Os machos da prole homozigotos para cada um dos alelos da cadeia pesada humana demonstraram fertilidade reduzida, que resultava da perda de atividade de ADAM6 de camundongo. O locus do gene variável da cadeia pesada de camundongo contém dois genes funcionais de ADAM6 (ADAM6a e ADAM6b) embutidos. Durante a humanização do locus do gene variável da cadeia pesada de camundongo, a sequência genômica humana inserida continha um pseudogene de ADAM6. ADAM6 de camundongo pode ser necessária para fertilidade e, dessa forma, a ausência de genes de ADAM6 de camundongo em loci humanizados do gene variável da cadeia pesada pode levar a uma redução na fertilidade, apesar da presença do pseudogene humano. Os Exemplos 7-11 descrevem a reengenharia de genes de ADAM6 de camundongo em um locus humanizado do gene variável da cadeia pesada e a restauração do nível fertilidade do tipo selvagem em camundongos com um locus humanizado de cadeia pesada de imunoglobulina humanizada.

Tabela 5

Versão do camundongo VELOCIMMUNE®	Cadeia pesada				Cadeia leve κ		
	V _H humana	Alelo	Gene V _H 5'		V _κ humana	Alelo	Gene V _κ 5'
V1	18	18hV _H	V _H 1-18		16	16hV _κ	V _κ 1-16
V2	39	39hV _H	V _H 4-39		30	30hV _κ	V _κ 2-29
V3	80	80hV _H	V _H 3-74		40	40hV _κ	V _κ 2-40

155/207

Exemplo 3**Populações de linfócitos em camundongos com Genes de imunoglobulina humanizados**

[00336] Populações de células B imaturas nas três versões diferentes de camundongos VELOCIMMUNE® foram avaliadas por citometria de fluxo.

[00337] Resumidamente, suspensões de células da medula óssea, baço e timo foram feitas usando métodos padronizados. As células foram ressuspensas a 5×10^5 células/ml em tampão de coloração de FACS BD Pharmingen, bloqueadas com anti-camundongo CD16/32 (BD Pharmingen), coradas com o coquetel de anticorpos apropriado e fixadas com BD CYTOFIX™, tudo de acordo com as instruções do fabricante. Péletes de células finais foram ressuspensos em 0,5 ml de tampão de coloração e analisados usando um BD FACSCALIBUR™ e o software BD CELLQUEST PRO™. Todos os anticorpos (BD Pharmingen) foram preparados em uma diluição/coquetel em massa e adicionados até uma concentração final de 0,5 mg/ 10^5 células.

[00338] A coloração dos coquetéis de anticorpos para medula óssea (A-D) foi a seguinte: A: IgM^b anti-camundongo-FITC, IgM^a anti-camundongo-PE, anti-CD45R(B220) de camundongo-APC; B: anti-CD43(S7) de camundongo-PE, anti-CD45R(B220) de camundongo-APC; C: anti-CD24(HSA) de camundongo-PE; anti-CD45R(B220) de camundongo-APC; D: anti-BP-1 de camundongo -PE, anti-CD45R(B220) de camundongo-APC.

[00339] A coloração de coquetéis de anticorpos para o baço e linfonodo inguinal (E-H) foi a seguinte: E: IgMb

anti-camundongo-FITC, IgMa anti-camundongo-PE, anti-CD45R(B220) de camundongo-APC; F: anti-cadeia leve Ig, $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$ de camundongo-FITC, anti-cadeia leve Igk de camundongo-PE, anti-CD45R(B220) de camundongo-APC; G: anti-Ly6G/C de camundongo-FITC, anti-CD49b(DX5) de camundongo-PE, anti-CD11b de camundongo-APC; H: anti-CD4(L3T4) de camundongo-FITC, anti-CD45R(B220) de camundongo-PE, anti-CD8a camundongo-APC. Os resultados são mostrados na FIG. 6.

[00340] Linfócitos isolados do baço ou linfonodo de camundongos VELOCIMMUNE® homozigotos foram corados para expressão de superfície dos marcadores B220 e IgM e analisados usando citometria de fluxo (FIG. 6). Os tamanhos das populações de células B maduras B220+ IgM+ em todas as versões de camundongos VELOCIMMUNE® testadas eram praticamente idênticos àqueles de camundongos do tipo selvagem, independentemente do número de segmentos gênicos VH que continham. Além disso, camundongos que contêm loci humanizados híbridos homozigotos da cadeia pesada de imunoglobulina, até mesmo aqueles com somente 3 segmentos gênicos VH, mas loci normais da cadeia leve κ de imunoglobulina de camundongo ou camundongos que contêm loci humanizados híbridos homozigotos da cadeia leve κ com loci normais da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo, também tinham números normais de células B220+ IgM+ em seus compartimentos periféricos (não mostrados). Esses resultados indicam que loci quiméricos com segmentos gênicos variáveis humanos e regiões constantes de camundongo podem popular completamente o compartimento de células B maduras. Além disso, o número de segmentos gênicos variáveis nos loci da cadeia pesada ou da cadeia

leve κ e, dessa forma, a diversidade teórica do repertório de anticorpos, não se correlaciona com a habilidade para gerar populações do tipo selvagem de células B maduras. Em contraste, camundongos com transgenes de imunoglobulina completamente humanos integrados aleatoriamente e loci inativados de imunoglobulina de camundongo possuem números reduzidos de células B nesses compartimentos, com a severidade do déficit dependendo do número de segmentos gênicos variáveis incluídos no transgene (Green e Jakobovits, 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). Isso demonstra que a estratégia de "humanização genética in situ" resulta em um resultado funcional final fundamentalmente diferente daquele dos transgenes integrados aleatoriamente obtidos na abordagem "knockout-mais-transgênica".

[00341] Exclusão alélica e escolha de locus. A habilidade para manter a exclusão alélica foi examinada em camundongos heterozigotos para versões diferentes do locus humanizado de cadeia pesada de imunoglobulina.

[00342] A humanização dos loci de imunoglobulina foi realizada em uma linhagem ES F1 (F1H4, Valenzuela e cols., 2003), derivada de embriões heterozigotos 129S6/SvEvTac e C57BL/6NTac. As sequências gênicas variáveis da cadeia pesada da linhagem germinativa humana são direcionadas ao alelo 129S6, que carrega o haplótipo IgM^a, enquanto o alelo do camundongo C576BL/6N não modificado abriga o haplótipo IgM^b. Essas formas alélicas de IgM podem ser distinguidas por citometria de fluxo usando anticorpos específicos para

os polimorfismos encontrados nos alelos de IgM^a ou IgM^b. Como mostrado na FIG. 6 (fileira inferior), as células B identificadas em camundongos heterozigotos para cada versão do locus humanizado de cadeia pesada expressam apenas um único alelo, IgM^a (o alelo humanizado) ou IgM^b (o alelo do tipo selvagem). Isso demonstra que os mecanismos envolvidos na exclusão alélica estão intactos em camundongos VELOCIMMUNE®. Além disso, o número relativo de células B positivas para o alelo humanizado (IgM^a) é aproximadamente proporcional ao número de segmentos gênicos V_H presentes. O locus humanizado de imunoglobulina é expresso em aproximadamente 30% das células B em camundongos VELOCIMMUNE® 1 heterozigotos, que possuem 18 segmentos gênicos V_H humanos, e em 50% das células B em camundongos VELOCIMMUNE® 2 e 3 heterozigotos (não mostrados), com 39 e 80 segmentos gênicos V_H humanos, respectivamente. Notavelmente, a proporção de células que expressam o alelo de camundongo humanizado versus do tipo selvagem (0,5 para camundongos VELOCIMMUNE® 1 e 0,9 para camundongos VELOCIMMUNE® 2) é maior do que a proporção do número de segmentos gênicos variáveis contidos nos loci humanizados versus loci do tipo selvagem (0,2 para camundongos VELOCIMMUNE® 1 e 0,4 para camundongos VELOCIMMUNE® 2). Isso pode indicar que a probabilidade de escolha de alelo é intermediária entre uma escolha aleatória de um ou outro cromossomo e uma escolha aleatória de qualquer segmento V RSS particular. Além disso, pode haver uma fração de células B, mas não todas, nas quais um alelo se torna acessível à recombinação, completa o processo e fecha a recombinação antes de o outro alelo se tornar acessível.

Além disso, a distribuição igual de células que possuem IgM de superfície (sIgM) derivada do locus híbrido humanizado de cadeia pesada ou do locus do tipo selvagem da cadeia pesada de camundongo é uma evidência de que o locus híbrido está operando em um nível normal. Em contraste, transgenes de imunoglobulina humana integrados aleatoriamente competem pobremente com loci do tipo selvagem de imunoglobulina de camundongo (Bruggemann e cols., 1989, "A Repertoire of Monoclonal antibodies with Human Heavy Chains from Transgenic Mice", *PNAS* 86: 6.709-6.713; Green e cols., 1994; Tuailon e cols., 1993, "Human Immunoglobulin Heavy-Chain Minilocus Recombination in Transgenic Mice: Gene-Segment Use in mu and gamma Transcripts", *PNAS USA* 90: 3.720-3.724). Isso demonstra ainda mais que as imunoglobulinas produzidas por camundongos VELOCIMMUNE® são funcionalmente diferentes daqueles produzidos por transgenes integrados aleatoriamente em camundongos feitos por abordagens "knockout-mais-transgênica".

[00343] Polimorfismos das regiões Ck não estão disponíveis em 129S6 ou C57BL/6N para examinar a exclusão alélica de loci humanizados versus não humanizados da cadeia leve κ . No entanto, todos os camundongos VELOCIMMUNE® possuem loci do tipo selvagem da cadeia leve λ de camundongo; portanto, é possível observar se o rearranjo e a expressão de loci humanizados da cadeia leve κ podem evitar a expressão da cadeia leve λ de camundongo. A proporção do número de células que expressam a cadeia leve κ humanizada em relação ao número de células que expressam cadeia leve λ de camundongo estava relativamente inalterada em camundongos VELOCIMMUNE® comparados com camundongos do

tipo selvagem, independentemente do número de segmentos gênicos V_k humanos inseridos no locus de cadeia leve k (FIG. 6, terceira fileira a partir do topo). Além disso, não havia aumento no número de células positivas duplas (k mais λ), indicando que a recombinação produtiva nos loci híbridos da cadeia leve k resulta em supressão apropriada da recombinação dos loci da cadeia leve λ de camundongo. Em contraste, camundongos que contêm transgenes da cadeia leve k integrados aleatoriamente com loci inativados da cadeia leve k de camundongo - mas loci do tipo selvagem da cadeia leve λ de camundongo - exibiram proporções λ/k dramaticamente aumentadas (Jakobovits, 1998), o que implica que os transgenes da cadeia leve k introduzidos não funcionam bem nesses camundongos. Isso demonstra ainda mais o resultado funcional final diferente observado em imunoglobulinas feitas por camundongos VELOCIMMUNE®, comparadas com aquelas feitas por camundongos "knockout-mais-transgênica".

[00344] Desenvolvimento de célula B. Como as populações de células B maduras em camundongos VELOCIMMUNE® se parece com aquelas de camundongos do tipo selvagem (descrito acima), é possível que defeitos na diferenciação inicial de células B sejam compensados pela expansão de populações de células B maduras. Os vários estágios de diferenciação de células B foram examinados por análise de populações de células B usando citometria de fluxo. A Tabela 6 apresenta a proporção da fração de células em cada linhagem de célula B definida por FACs, usando marcadores específicos da superfície celular, em camundongos VELOCIMMUNE®, comparados com ninhadas do tipo selvagem.

[00345] O desenvolvimento inicial de células B ocorre na medula óssea, e estágios diferentes da diferenciação de células B são caracterizados por alterações nos tipos e nas quantidades da expressão do marcador da superfície celular. Essas diferenças na expressão de superfície está correlacionada com as alterações moleculares que ocorrem nos loci de imunoglobulina dentro da célula. A transição de célula pró-B para pré-B exige o rearranjo e a expressão bem sucedidos de proteína funcional da cadeia pesada, enquanto a transição do estágio pré-B em B madura é governada pelo rearranjo e expressão corretos de uma cadeia leve κ ou λ . Dessa forma, a transição ineficiente entre estágios de diferenciação de células B pode ser detectada por alterações nas populações relativas de células B em certo estágio.

Tabela 6

Versão de camundongos VELOCIMMUNE®	Medula óssea				Baço	
	pró-B	pré-B	Imaturas	Maduras	Emergentes	Maduras
	CD43 ^{hi}	CD24 ^{hi}	B220 ^{lo}	B220 ^{hi}	B220 ^{hi}	B220 ^{hi}
	B220 ^{lo}	B220 ^{lo}	IgM ⁺	IgM ⁺	IgM ⁺ IgD ⁺	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

[00346] Não foram observados defeitos importantes na diferenciação de células B em qualquer um dos camundongos VELOCIMMUNE®. A introdução de segmentos do gene da cadeia pesada humana não parece afetar a transição pró-B para pré-B, e a introdução de segmentos gênicos da cadeia leve κ humana não afeta a transição pré-B para B em camundongos VELOCIMMUNE®. Isso demonstra que moléculas de

imunoglobulina "quiméricas reversas" que possuem regiões variáveis humanas e constantes de camundongo funcionam normalmente no contexto de sinalização de célula B e moléculas co-receptores que levam à diferenciação apropriada de células B em um ambiente de camundongo. Em contraste, o equilíbrio entre as diferentes populações durante a diferenciação de células B está perturbado em graus variáveis em camundongos que contêm transgenes de imunoglobulina integrados aleatoriamente e loci endógenos inativados da cadeia pesada ou da cadeia leve κ (Green e Jakobovits, 1998).

Exemplo 4

Repertório de genes variáveis em camundongos com imunoglobulina humanizada

[00347] O uso de segmentos gênicos variáveis humanos no repertório de anticorpos humanizados de camundongos VELOCIMMUNE® foi analisado por transcriptase reversa-reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) de regiões variáveis humanas de várias fontes, incluindo esplenócitos e células de hibridoma. Sequência da região variável, uso de segmento gênico, hipermutação somática e diversidade juncional de segmentos rearranjados do gene da região variável foram determinados.

[00348] Resumidamente, RNA total foi extraído de 1×10^7 - 2×10^7 esplenócitos ou cerca de 10^4 - 10^5 células de hibridoma usando TRIZOL™ (Invitrogen) ou Qiagen RNEASY™ Mini Kit (Qiagen) e sensibilizado com iniciadores específicos para região constante de camundongo usando o sistema de RT-PCR SUPERScript™ III One-Step (Invitrogen). As reações foram realizadas com 2-5 μ l de RNA de cada

amostra usando os iniciadores específicos para constante 3' mencionados anteriormente pareados com iniciadores-líderes em pool para cada família de regiões variáveis humanas tanto para a cadeia pesada quanto para a cadeia leve κ , separadamente. Volumes de reagentes e iniciadores e condições de RT-PCR/PCR foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. As sequências dos iniciadores se basearam em várias fontes (Wang e Stollar, 2000, "Human Immunoglobulin Variable Region Gene Analysis by Single Cell RT-PCR", J. Immunol. Methods 244: 217-225; conjuntos Ig-iniciador, Novagen). Quando apropriado, reações de PCR secundária nested foram realizadas com framework iniciadores família-específicos em pool e o mesmo iniciador específico para constante 3' de imunoglobulina de camundongo usado na reação primária. Aliquotas (5 μ l) de cada reação foram analisadas por eletroforese em agarose e os produtos de reação foram purificados da agarose usando um Kit de Extração de Gel MONTAGE™ (Millipore). Os produtos purificados foram clonados usando o Sistema de Clonagem TOPO™ TA (Invitrogen) e transformados em células de E. coli DH10 β por eletroporação. Clones individuais foram selecionados de cada reação de transformação e desenvolvidos em 2 ml culturas em caldo LB com seleção de antibiótico de um dia para o outro a 37°C. DNA de plasmídeo foi purificado de culturas bacterianas por uma abordagem baseada em kit (Qiagen).

[00349] Uso de gene variável de imunoglobulina. DNA de plasmídeo de clones tanto da cadeia pesada quanto da cadeia leve κ foi sequenciado com iniciadores reversos T7 ou M13 no Analisador Genético ABI 3100 (Applied Biosystems). Os

dados brutos de sequências foram importados em SEQUENCHER™ (versão 4.5, Gene Codes). Cada sequência foi montada em *contigs* e alinhada em sequências de imunoglobulina humana usando a função de pesquisa de IMGT V-Quest (Brochet e cols., 2008, "IMGTN-QUEST: 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 o uso de segmento V_H, D_H, J_H e V_K, J_K humanos. As sequências foram comparadas com sequências de linhagem germinativa para hipermutação somática e análise da junção de recombinação.

[00350] Foram gerados camundongos por células ES contendo a modificação inicial da cadeia pesada (Alelo híbrido 3hV_H-CRE, parte de baixo da FIG. 2A) por complementação RAG (Chen e cols., 1993, "RAG-2-Deficient Blastocyst Complementation: an Assay of Gene Function in Lymphocyte Development", *PNAS USA* 90: 4.528-4.532), e foi preparado cDNA a partir de RNA de esplenócito. O cDNA foi amplificado usando conjuntos de iniciadores (descritos acima) específicos para o mRNA da cadeia pesada quimérica previsto que surgiria por recombinação V(D)J dentro dos segmentos gênicos humanos inseridos e subsequente *splicing* em domínios constantes de IgM ou IgG de camundongo. As sequências derivadas desses clones de cDNA (não mostradas) demonstraram que tinha ocorrido a recombinação V(D)J adequada dentro das sequências gênicas variáveis humanas, que os segmentos gênicos V(D)J humanos rearranjados foram adequadamente *spliced in-frame* em domínios constantes de camundongo, e que havia ocorrido a recombinação de mudança de classe. Foi realizada análise de sequência adicional de

produtos de mRNA de loci híbridos de imunoglobulina subsequentes.

[00351] Em um experimento similar, células B de camundongos do tipo selvagem e VELOCIMMUNE® não imunizadas foram separadas por citometria de fluxo com base na expressão de superfície de B220 e IgM ou IgG. As células B220⁺ IgM⁺ ou IgG⁺ de superfície (sIgG⁺) foram reunidas em pool e sequências V_H e V_K foram obtidas após amplificação por RT-PCR e clonagem (descritos acima). O uso de gene representativo em um conjunto de cDNAs amplificados por RT-PCR de camundongos VELOCIMMUNE® 1 não imunizados (Tabela 7) e camundongos VELOCIMMUNE® 3 (Tabela 8) foi registrado (*RSS defeituoso; † ausente ou pseudogene). Asterisco: segmentos gênicos com RSS defeituoso. †: segmento gênico está ausente ou pseudogene.

Tabela 7

V_H observada

1-18	3
1-17P	0
3-16*	0
3-15	13
3-13	9
3-11	6
3-9	8
1-8	6
3-7	2
2-5	2
1-3	0

1-2	11
6-1	5

J_H observada

1	2
2	1
3	8
4	33
5	5
6	16

D_H observada

1-1	1
2-2	2
3-3	4
4-4	0
5-5	0
5-18	4
6-6	5
1-7	7
2-8	0
3-9	4
3-10	2
4-11	1
5-12	1
6-13	3
1-14	0
2-15	0

3-16	1
4-17	0
6-19	2
1-20	2
2-21	1
3-22	0
4-23	2
5-24	1
6-25	1
1-26	6
7-27	10

V_x observada

1-16	2
3-15	1
1-12	5
3-11	1
1-9	5
1-8	2
3-7*	0
1-6	5
1-5	8
5-2	6
4-1	8

J_x observada

1	12
2	10

3	5
4	10
5	0

Tabela 8**V_H observada**

7-81†	0
3-74†	0
3-73	1
3-72	2
2-70	2
1-69	3
3-66	1
3-64	1
4-61	1
4-59	10
1-58	0
3-53	0
5-51	5
3-49	2
3-48	7
1-46	1
1-45	0
3-43	10
4-39	4
3-38*	0
3-35*	0
4-34	8

3-33	14
4-31	4
3-30	13
4-28	0
2-26	0
1-24	3
3-23	18
3-21	0
3-20	0
1-18	4
1-17P	1
3-16*	0
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

D_H observada

1-1	7
2-2	8
3-3	9
4-4	4

5-5	6
5-18	6
6-6	29
1-7	30
2-8	4
3-9	8
3-10	10
4-11	4
5-12	5
6-13	17
1-14	2
2-15	3
3-16	4
4-17	3
6-19	8
1-20	3
2-21	1
3-22	5
4-23	2
5-24	2
6-25	2
1-26	17
7-27	7

J_H observada

1	2
2	8

3	26
4	95
5	11
6	58

V_k observada

2-40	1
1-39	34
1-37	2
1-33	35
2-30	8
2-29	2
2-28	7
1-27	5
2-24	7
6-21*	3
3-20	10
1-17	13
1-16	10
3-15	13
1-12	13
3-11	13
1-9	11
1-8	1
3-7*	0
1-6	6
1-5	7

5-2	0
4-1	21

J_K observada

1	50
2	37
3	28
4	64
5	22

[00352] Como mostrado nas Tabelas 7 e 8, quase todos os segmentos gênicos humanos funcionais V_H, D_H, J_H, V_K e J_K são utilizados. Dos segmentos funcionais gênicos variáveis descritos, mas não detectados nos camundongos VELOCIMMUNE® desse experimento, vários supostamente possuem sequências sinalizadoras de recombinação (RSS) defeituosas e, dessa forma, era de se esperar que não fossem expressos (Feeney, 2000, "Factors that Influence Formation of Repertoire", *Immunol. Res.* 21: 195-202). Análise de vários outros conjuntos de sequências de imunoglobulina de vários camundongos VELOCIMMUNE®, isolados de repertórios tanto virgens quanto imunizados, demonstrou uso desses segmentos gênicos, embora em frequências mais baixas (dados não mostrados). Dados de uso de gene demonstraram que todos os segmentos gênicos humanos funcionais V_H, D_H, J_H, V_K e J_K contidos em camundongos VELOCIMMUNE® foram observados em vários repertórios virgens e imunizados (dados não mostrados). Embora o segmento gênico humano V_H7-81 tenha sido identificado na análise de lócus de sequências da cadeia pesada humana (Matsuda e cols., 1998, "The Complete

Nucleotide Sequence of the Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus", *J. Exp. Med.* 188: 2.151-2.162), ele não está presente nos camundongos VELOCIMMUNE®, como confirmado por novo sequenciamento de todo o genoma do camundongo VELOCIMMUNE® 3.

[00353] Sequências de cadeias pesadas e leves de anticorpos sabidamente mostram variabilidade excepcional, especialmente em segmentos polipeptídicos curtos dentro do domínio variável rearranjado. Essas regiões, conhecidas como regiões hipervariáveis ou regiões determinantes de complementaridade (CDRs), ciam o sítio de ligação para antígeno na estrutura da molécula de anticorpo. As sequências polipeptídicas intervenientes são denominadas regiões *framework* (FRs). Há três CDRs (CDR1, CDR2, CDR3) e 4 FRs (FR1, FR2, FR3, FR4) tanto nas cadeias pesadas quanto nas leves. Uma CDR, CDR3, é única, na medida em que essa CDR é criada por recombinação dos segmentos gênicos V_H , D_H e J_H e V_K e J_K e gera uma quantidade significativa de diversidade de repertório antes do antígeno ser encontrado. Essa união é imprecisa em função tanto de deleções de nucleotídeos por meio de atividade de exonuclease quanto de adições não codificadas por modelo por meio de desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) e, dessa forma, permite que novas sequências resultem do processo de recombinação. Embora FRs possam mostrar mutação somática substancial em consequência da alta mutabilidade da região variável como um todo, a variabilidade não é, no entanto, distribuída igualmente através da região variável. CDRs são regiões concentradas e localizadas de alta variabilidade na superfície da molécula de anticorpo que permitem a ligação

de antígeno. Sequências da cadeia pesada e da cadeia leve de anticorpos selecionados de camundongos VELOCIMMUNE® em torno da junção de CDR3 que demonstram diversidade juncional são mostradas na FIG. 7A e 7B, respectivamente.

[00354] Como mostrado na FIG. 7A, adições de nucleotídeos codificados por não-modelo (N-adições) são observadas nas junções V_H-D_H e D_H-J_H em anticorpos de camundongos VELOCIMMUNE®, indicando função adequada de TdT com os segmentos humanos. Os pontos finais dos segmentos V_H , D_H e J_H em relação às suas contrapartes da linhagem germinativa indicam que a atividade de exonuclease também ocorreu. Diferentemente do locus da cadeia pesada, os rearranjos da cadeia leve κ humana exibem poucas ou nenhuma adição TdT em CDR3, que é formada pela recombinação dos segmentos V_κ e J_κ (FIG. 7B). Isso é esperado em função da ausência de expressão de TdT em camundongos durante rearranjos da cadeia leve na transição pré-B para célula B. A diversidade observada na CDR3 de regiões V_κ humanas rearranjadas é introduzida predominantemente por meio de atividade de exonuclease durante o evento de recombinação.

[00355] Hipermutação somática. Diversidade adicional é acrescentada às regiões variáveis de genes de imunoglobulina rearranjados durante a reação do centro germinal por um processo denominado hipermutação somática. Células B que expressam regiões variáveis somaticamente mutadas competem com outras células B por acesso ao antígeno apresentado pelas células dendríticas foliculares. Aquelas células B com afinidade maior pelo antígeno se expandirão ainda mais e passarão por mudança de classe antes de sair para a periferia. Dessa forma, células B que

expressam isótipos mudados tipicamente encontraram antígeno e passaram por reações do centro germinal e terão números aumentados de mutações em relação às células B virgens. Além disso, seria de se esperar que sequências da região variável de células B sIgM⁺ predominantemente virgens tivessem relativamente menos mutações do que sequências variáveis de células B sIgG⁺ que passaram por seleção de antígeno.

[00356] Sequências de clones aleatórios de V_H ou V_K de células B sIgM⁺ ou sIgG⁺ de camundongos VELOCIMMUNE® não imunizados ou células B sIgG⁺ de camundongos imunizados foram comparadas com seus segmentos gênicos variáveis de linhagem germinativa e as alterações em relação à sequência de linhagem germinativa anotadas. As sequências de nucleotídeos resultantes foram traduzidas *in silico* e as mutações que levam a alterações de aminoácidos também anotadas. Foram conferidos os dados de todas as regiões variáveis e o percentual de alteração em certa posição foi calculado (FIG. 8).

[00357] Como mostrado na FIG. 8, regiões variáveis da cadeia pesada humana derivadas de células B sIgG⁺ de camundongos VELOCIMMUNE® não imunizados exibiram muito mais nucleotídeos em relação às células B sIgM⁺ dos mesmos pools de esplênócitos, e regiões variáveis da cadeia pesada derivadas de camundongos imunizados exibiram ainda mais alterações. O número de alterações está aumentado nas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) em relação às regiões framework, indicando seleção de antígeno. As sequências de aminoácidos correspondentes das regiões variáveis da cadeia pesada humana também exibem

números significativamente maiores de mutações em IgG versus IgM e ainda mais em IgG imunizada. Essas mutações novamente parecem ser mais frequentes nas CDRs comparadas com as sequências framework, sugerindo que os anticorpos eram selecionados por antígeno in vivo. Um aumento similar no número das mutações de nucleotídeos e aminoácidos é observado nas sequências de Vk derivadas de células B IgG+ de camundongos imunizados.

[00358] O uso de gene e a frequência de hipermutação somática observados em camundongos VELOCIMMUNE® demonstraram que essencialmente todos os segmentos gênicos presentes são capazes de rearranjo para formar anticorpos quiméricos reversos completamente funcionais nesses camundongos. Além disso, anticorpos VELOCIMMUNE® participam plenamente dentro do sistema imune do camundongo para passar por seleção por afinidade e maturação para criar anticorpos humanos completamente maduros que podem neutralizar eficazmente seu antígeno-alvo. Camundongos VELOCIMMUNE® são capazes de montar respostas imunes robustas a múltiplas classes de antígenos que resultam no uso uma ampla gama de anticorpos humanos que possuem afinidade elevada e são adequados para uso terapêutico (dados não mostrados).

Exemplo 5

Análise da estrutura linfóide e isótipos séricos

[00359] As estruturas macroscópicas do baço, linfonodos inguinais, placas de Peyer e timo de amostras de tecido de camundongos do tipo selvagem ou VELOCIMMUNE® coradas com H&E foram examinadas por microscopia óptica. Os níveis de isótipos de imunoglobulina no soro coletado de camundongos

do tipo selvagem e VELOCIMMUNE® foram analisados usando tecnologia LUMINEX™.

[00360] Estrutura do órgão linfóide. A estrutura e função dos tecidos linfóides são, em parte, dependentes do desenvolvimento adequado de células hematopoiéticas. Um defeito no desenvolvimento ou função de células B pode ser exibido como uma alteração na estrutura dos tecidos linfóides. Mediante análise de cortes de tecido corados, nenhuma diferença significativa na aparência de órgãos linfóides secundários entre camundongos do tipo selvagem e VELOCIMMUNE® foi identificada (dados não mostrados).

[00361] Níveis séricos de imunoglobulina. O nível de expressão de cada isótipo é similar em camundongos do tipo selvagem e VELOCIMMUNE® (FIG. 9A, 9B e 9C). Isso demonstra que a humanização dos segmentos gênicos variáveis não teve efeito adverso aparente após mudança de classe ou expressão e secreção de imunoglobulina e, portanto, aparentemente mantêm todas as sequências endógenas de camundongo necessárias a essas funções.

Exemplo 6

Imunização e produção de anticorpo em camundongos com imunoglobulina humanizada

[00362] Versões diferentes de camundongos VELOCIMMUNE® foram imunizadas com antígeno para examinar a resposta humoral ao ataque com antígeno estranho.

[00363] Imunização e desenvolvimento de hibridoma. Camundongos VELOCIMMUNE® e do tipo selvagem podem ser imunizados com um antígeno na forma de proteína, DNA, uma combinação de DNA e proteína, ou células que expressam o antígeno. Os animais são tipicamente reforçados a cada três

semanas por um total de duas a três vezes. Após cada reforço de antígeno, amostras de soro de cada animal são coletadas e analisadas quanto às respostas de anticorpos antígeno-específicos por determinação da titulação sérica. Antes da fusão, os camundongos receberam um reforço final pré-fusão de 5 µg de proteína ou DNA, como desejado, por meio de injeções intraperitoneais e/ou intravenosas. Os esplenócitos são coletados e fundidos às células de mieloma Ag8.653 em uma câmara de eletrofusão de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante (Cyto Pulse Sciences Inc., Glen Burnie, MD). Dez dias após a cultura, os hibridomas são avaliados quanto à especificidade de antígeno usando um ensaio ELISA (Harlow e Lane, 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Nova York). Alternativamente, células B antígeno-específicas são isoladas diretamente de camundongos VELOCIMMUNE® imunizados e avaliadas usando técnicas-padrão, que incluem aquelas aqui descritas, para obter anticorpos humanos específicos para um antígeno de interesse (por exemplo, veja US 2007/0280945A1, aqui incorporada por referência em sua totalidade).

[00364] Determinação da titulação sérica. Para monitorar resposta séricas anti-antígeno do animal, são coletadas amostras de soro cerca de 10 dias após cada reforço e as titulações são determinadas usando ELISA específica para o antígeno. Resumidamente, placas de 96 poços Nunc MAXISORP™ são revestidas com 2 µg/ml de antígeno de um dia para o outro a 4°C e bloqueadas com albumina sérica bovina (Sigma, St. Louis, MO). É permitido que amostras de soro em diluições seriadas de 3 vezes se liguem

às placas por uma hora em temperatura ambiente. As placas são então lavadas com PBS contendo Tween-20 0,05% e a IgG ligada é detectada usando anti-Fc de camundongo de cabra conjugado à HRP (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA) para titulação total de IgG, ou anticorpos policlonais isótipo-específicos ou cadeia leve-específicos marcados com biotina (Southern Biotech Inc.) para titulações específicas de isótipo, respectivamente. Para anticorpos marcados com biotina, após lavagem da placa, estreptavidina conjugada à HRP (Pierce, Rockford, IL) é adicionada. Todas as placas são desenvolvidas usando substratos colorimétricos como, por exemplo, BD OPTeia™ (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Após a reação ser interrompida com 1 M de ácido fosfórico, são registradas absorções ópticas a 450 nm e os dados são analisados usando o software PRISM™ de Graph Pad. As diluições necessárias para obter duas vezes o sinal de fundo são definidas como titulação.

[00365] Em um experimento, camundongos VELOCIMMUNE® foram imunizados com receptor de interleucina humana-6 (hIL-6R). Um conjunto representativo de titulações séricas para camundongos VELOCIMMUNE® e do tipo selvagem imunizados com hIL-6R é mostrado na FIG. 10A e 10B.

[00366] Camundongos VELOCIMMUNE® e do tipo selvagem montaram respostas fortes contra IL-6R com faixas de titulação similares (FIG. 10A). Vários camundongos dos grupos de VELOCIMMUNE® e do tipo selvagem alcançaram uma resposta máxima após um único reforço de antígeno. Esses resultados indicam que a potência e a cinética da resposta imune a esse antígeno foram similares nos camundongos

VELOCIMMUNE® e do tipo selvagem. Essas respostas de anticorpos antígeno-específicos foram ainda analisadas para examinar os isótipos particulares dos anticorpos antígeno-específicos encontrados nos soros. Os grupos de VELOCIMMUNE® e do tipo selvagem despertaram predominantemente uma resposta de IgG1 (FIG. 10B), sugerindo que a mudança de classe durante a resposta humoral é similar em camundongos de cada tipo.

[00367] Determinação da afinidade de ligação de anticorpo ao antígeno em solução. Um ensaio de competição em solução baseado em ELISA é tipicamente projetado para determinar a afinidade de ligação do anticorpo ao antígeno.

[00368] Resumidamente, anticorpos em meio condicionado são pré-misturados com diluições seriais de proteína de antígeno que variam de 0 a 10 mg/ml. As soluções da mistura de anticorpo e antígeno são então incubadas por duas a quatro horas em temperatura ambiente até alcançar equilíbrios de ligação. As quantidades de anticorpo livre nas misturas são então medidas usando um ELISA quantitativo em sanduíche. Placas de 96 poços MAXISORB™ (WVR, West Chester, PA) são revestidas com 1 µg/ml de proteína de antígeno em solução de PBS de um dia para o outro a 4°C, seguida por bloqueio não específico de BSA. As soluções da mistura de anticorpo-antígeno são então transferidas para essas placas, seguido por incubação de uma hora. As placas são então lavadas com tampão de lavagem e os anticorpos ligados às placas foram detectados com um reagente de anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à HRP cabra (Jackson Immuno Research Lab) e desenvolvidas usando substratos colorimétricos como, por

exemplo, BD OPTEIA™ (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Após a reação ser interrompida com 1 M de ácido fosfórico, são registradas absorções ópticas a 450 nm e os dados são analisados usando o software PRISM™ de Graph Pad. A dependência dos sinais nas concentrações de antígeno em solução é analisada com uma análise por ajuste de 4 parâmetros e registrada como IC₅₀, a concentração de antígeno necessária para obter uma redução de 50% do sinal das amostras de anticorpo sem a presença de antígeno em solução.

[00369] Em um experimento, camundongos VELOCIMMUNE® foram imunizados com hIL-6R (como descrito acima). As FIGS. 11A e 11B mostram um conjunto representativo de medições de afinidade para anticorpos anti-hIL-6R de camundongos VELOCIMMUNE® e do tipo selvagem.

[00370] Após os camundongos imunizados receberem um terceiro reforço de antígeno, as titulações séricas são determinadas usando um ensaio ELISA. Os esplenócitos são isolados de grupos selecionados de camundongos do tipo selvagem e VELOCIMMUNE® coortes e fundidos com células de mieloma Ag8.653 para formar hibridomas e desenvolvidos sob seleção (como descrito acima). De um total de 671 hibridomas anti-IL-6R produzidos, foi verificado que 236 expressam anticorpos antígeno-específicos. Meio coletado de poços antígeno-positivos foi usado para determinar a afinidade de ligação do anticorpo ao antígeno usando uma ELISA de competição em solução. Anticorpos derivados de camundongos VELOCIMMUNE® exibem uma ampla gama de afinidades na ligação ao antígeno em solução (FIG. 11A). Além disso, foi constatado que 49 de 236 hibridomas anti-

IL-6R bloqueiam a ligação IL-6 ao receptor em um bioensaio in vitro (dados não mostrados). Além disso, esses 49 anticorpos de bloqueio anti-IL-6R exibiam uma gama de afinidades elevadas em solução similar àquela de anticorpos de bloqueio derivados da imunização paralela de camundongos do tipo selvagem (FIG. 11B).

Exemplo 7

Construção de um vetor de direcionamento de ADAM6 de camundongo

[00371] Em função da substituição de loci do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo com loci do gene variável da cadeia pesada de imunoglobulina humana, as versões iniciais de camundongos VELOCIMMUNE® não possuem expressão de genes de ADAM6 de camundongo. Em particular, camundongos-machos VELOCIMMUNE® demonstram uma redução na fertilidade. Dessa forma, a habilidade para expressar ADAM6 foi reprogramada em camundongos VELOCIMMUNE® para resgatar o defeito de fertilidade.

[00372] Um vetor de direcionamento para inserção de genes de ADAM6a e ADAM6b de camundongo em um locus humanizado de cadeia pesada foi construído usando tecnologia de engenharia genética VELOCIGENE® (supra) para modificar um cromossomo bacteriano artificial (BAC) 929d24, que foi obtido de Dr. Frederick Alt ("Harvard University"). DNA de BAC 929d24 foi projetado para conter fragmentos genômicos que contêm os genes de ADAM6a e ADAM6b de camundongo e um cassete de higromicina para deleção direcionada de um pseudogene de ADAM6 humana (hADAM6Ψ) localizado entre os segmentos gênicos humanos VH1-2 e VH6-1

de um locus humanizado de cadeia pesada (FIG. 12).

[00373] Primeiro, um fragmento genômico contendo o gene de ADAM6b de camundongo, aproximadamente 800 bp de sequência acima (5') e aproximadamente 4.800 bp de sequência abaixo (3') foi subclonado pelo clone de BAC 929d24. Um segundo fragmento genômico contendo o gene de ADAM6a de camundongo, aproximadamente 300 bp de sequência acima (5') e aproximadamente 3.400 bp de sequência abaixo (3'), foi separadamente subclonado pelo clone de BAC 929d24. Os dois fragmentos genômicos contendo os genes de ADAM6a e ADAM6b de camundongo foram ligados a um cassete de higromicina flanqueado por sítios de recombinação Frt para criar o vetor de direcionamento (vetor de direcionamento de ADAM6 de camundongo, Figura 12; ID. DE SEQ. N°: 3). Sítios de enzima de restrição diferentes foram projetados na extremidade 5' do vetor de direcionamento após o gene de ADAM6b de camundongo e na extremidade 3' após o gene de ADAM6a de camundongo (parte de baixo da FIG. 12) para ligação no locus humanizado de cadeia pesada.

[00374] Uma modificação separada foi feita a um clone de BAC contendo uma substituição de loci do gene variável da cadeia pesada de camundongo com loci do gene variável da cadeia pesada humana, incluindo o pseudogene de ADAM6 humana (hADAM6Ψ) localizado entre os segmentos gênicos humanos VH1-2 e VH6-1 do locus humanizado para a ligação subsequente do vetor de direcionamento de ADAM6 de camundongo (FIG. 13).

[00375] Resumidamente, um cassete de neomicina flanqueado por sítios de recombinação loxP foi projetado para conter braços de homologia contendo sequência genômica

humana nas posições 3' do segmento gênico VH1-2 humano (5' com relação a hADAM6Ψ) e 5' do segmento gênico VH6-1 humano (3' com relação a hADAM6Ψ; veja o meio da FIG. 13). A localização do sítio de inserção dessa construção de direcionamento era cerca de 1,3 kb 5' e aproximadamente 350 bp 3' do pseudogene de ADAM6 humana. A construção de direcionamento também incluía os mesmos sítios de restrição que o vetor de direcionamento de ADAM6 de camundongo para permitir ligação de BAC subsequente entre o clone de BAC modificado contendo a deleção do pseudogene de ADAM6 humana e o vetor de direcionamento de ADAM6 de camundongo.

[00376] Após digestão do DNA de BAC derivado de ambas as construções, os fragmentos genômicos foram ligados juntos para construir um clone de BAC modificado geneticamente contendo um locus humanizado de cadeia pesada que contém uma sequência genômica colocada ectopicamente que compreende sequências de nucleotídeos de ADAM6a e ADAM6b de camundongo. A construção de direcionamento final para a deleção de uma gene de ADAM6 humana dentro de um locus humanizado de cadeia pesada e inserção de sequências de ADAM6a e ADAM6b de camundongo em células ES continha, de 5' para 3', um fragmento genômico 5' contendo aproximadamente 13 kb de sequência genômica humana 3' do segmento gênico VH1-2 humano, aproximadamente 800 bp de sequência genômica de camundongo abaixo do gene de ADAM6b de camundongo, o gene de ADAM6b de camundongo, aproximadamente 4.800 bp de sequência genômica acima do gene de ADAM6b de camundongo, um sítio Frt 5', um cassete de higromicina, um sítio Fit 3', aproximadamente 300 bp de sequência genômica de camundongo abaixo do gene de ADAM6a

de camundongo, o gene de ADAM6a de camundongo, aproximadamente 3.400 bp de sequência genômica de camundongo acima do gene de ADAM6a de camundongo e um fragmento genômico 3' contendo aproximadamente 30 kb de sequência genômica humana 5' do segmento gênico VH6-1 humano (parte de baixo da FIG. 13).

[00377] O clone de BAC modificado geneticamente (descrito acima) foi usado na eletroporação de células de camundongo ES que continham um locus humanizado de cadeia pesada para criar células ES modificadas que compreende uma sequência genômica de camundongo colocada ectopicamente que compreende sequências de ADAM6a e ADAM6b de camundongo dentro de um locus humanizado de cadeia pesada. Células ES positivas que contêm o fragmento genômico ectópico de camundongo dentro do locus humanizado de cadeia pesada foram identificadas por um ensaio de PCR quantitativa usando sondas TAQMAN™ (Lie e Petropoulos, 1998, "Advances in Quantitative PCR Technology: 5' nuclease Assays", *Curr. Opin. Biotechnol.* 9(1): 43-48). As regiões acima e abaixo fora da porção modificada do locus humanizado de cadeia pesada foram confirmadas por PCR usando iniciadores e sondas localizados dentro da região modificada para confirmar a presença da sequência genômica ectópica de camundongo dentro do locus humanizado de cadeia pesada, bem como o cassete de higromicina. A sequência de nucleotídeos através do ponto de inserção acima incluía o seguinte, o que indica sequência genômica da cadeia pesada humana acima do ponto de inserção e um sítio de restrição I-CeuI (contido entre parênteses abaixo) ligado contigualmente à sequência genômica de camundongo presente no ponto de

inserção:

(CCAGCTTCATTAGTAATCGTTCATCTGTGGTAAAAAGGCAGGATTTGAAGCGATGGAA
GATGGGAGTACGGGGCGTTGGAAGACAAAGTGCCACACAGCGCAGCCTTCGTCTAGACC
CCCGGGCTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAG)GGGATGACAGATTCTCTGTTCAGT
GCACTCAGGGTCTGCCTCCACGAGAATCACCATGCCCTTTCTCAAGACTGTGTTCTGTG
CAGTGCCCTGTCAGTGG (ID. DE SEQ. N°: 4).

A sequência de nucleotídeos através do ponto de inserção abaixo na extremidade 3' da região visada incluía o seguinte, o que indica a sequência genômica de camundongo e um sítio de restrição PI-SceI (contido entre parênteses abaixo) ligado contiguamente à sequência genômica da cadeia pesada humana abaixo do ponto de inserção:

(AGGGGTCGAGGGGAATTTTACAAAGAACAAAGAAGCGGGCATCTGCTGACATGAGGG
CCGAAGTCAGGCTCCAGGCAGCGGGAGCTCCACCGCGGTGGCGCCATTTTCATTACCTCT
TTCTCCGCACCCGACATAGATAAAGCTT)ATCCCCACCAAGCAAATCCCCCTACCTGG
GGCCGAGCTTCCCGTATGTGGGAAAATGAATCCCTGAGGTGATTGCTGCATGCAATGA
AATTCAACTAG (ID. DE SEQ. N°: 5).

[00378] As células ES direcionadas descritas acima foram usadas como células ES doadoras e introduzidas em um embrião de camundongo em estágio de 8 células pelo método de modificação genética de camundongos VELOCIMOUSE® (veja, por exemplo, Patentes U.S. Nos 7.659.442, 7.576.259, 7.294.754). Camundongos que abrigam um locus humanizado de cadeia pesada contendo uma sequência genômica ectópica de camundongo que compreende sequências de ADAM6a e ADAM6b de camundongo foram identificadas por genotipagem usando um ensaio de modificação de alelo (Valenzuela e cols., 2003) que detectou a presença do genes de ADAM6a e ADAM6b de camundongo dentro do locus humanizado de cadeia pesada.

[00379] Camundongos que abrigam um locus humanizado de

cadeia pesada que contém genes de ADAM6a e ADAM6b de camundongo são cruzados com uma cepa de camundongo de deleção FLPe (veja, por exemplo, Rodriguez e cols., 2000, "High-Efficiency Deleter Mice Show That FLPe is an Alternative to Cre-loxP". *Nature Genetics* 25: 139-140) a fim de remover qualquer cassete de higromicina Frt'ed introduzido pelo vetor de direcionamento que não é removido, por exemplo, no estágio da célula ES ou no embrião. Opcionalmente, o cassete de higromicina é retido nos camundongos.

[00380] Os filhotes são genotipados e um filhote heterozigoto para um locus humanizado de cadeia pesada contendo um fragmento genômico ectópico de camundongo que compreende sequências de ADAM6a e ADAM6b de camundongo é selecionado para caracterização da expressão do gene de ADAM6 de camundongo e da fertilidade.

Exemplo 8

Caracterização de camundongos de resgate de ADAM6

[00381] Citometria de fluxo. Três camundongos com 25 semanas de idade homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e leve κ humana ($H^{+}/\kappa^{+}/+$) e três camundongos com 18-20 semanas de idade homozigotos para cadeia pesada humana e leve κ humana que possuem o fragmento genômico ectópico de camundongo que codifica os genes de ADAM6a e ADAM6b de camundongo dentro de ambos os alelos do locus da cadeia pesada humana ($H^{+}/A6^{res\kappa^{+}}/+$) foram sacrificados para identificação e análise de populações de células de linfócitos por FACs no Sistema BD LSR II System (BD Bioscience). Linfócitos foram separados para linhagens celulares específicas e analisados quanto à progressão

através de vários estágios de desenvolvimento de células B. Tecidos coletados dos animais incluíram sangue, baço e medula óssea. O sangue foi coletado em tubos *microtainer* BD com EDTA (BD Biosciences). A medula óssea foi coletada de fêmures por irrigação com meio RPMI completo suplementado com soro fetal de bezerro, piruvato de sódio, HEPES, 2-mercaptoetanol, aminoácidos não essenciais e gentamicina. Células sanguíneas vermelhas do sangue, baço e preparações da medula óssea foram lisadas com um tampão de lise à base de cloreto de amônio (por exemplo, tampão de lise ACK), seguido por lavagem com meio RPMI completo.

[00382] Para coloração de populações de células, 1×10^6 células de várias fontes de tecido foram incubadas com anti-CD16/CD32 de camundongo (2.4G2, BD Biosciences) no gelo por 10 minutos, seguido por marcação com um ou uma combinação dos seguintes coquetéis de anticorpos por 30 minutos no gelo.

[00383] Medula óssea: anti-camundongo FITC-CD43 (1B1a1, BioLegend), PE-ckit (2B8, BioLegend), PeCy7-IgM (11/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-IgD (11-26c.2a, BioLegend), APC-eFluor780-B220 (RA3-6B2, eBioscience), A700-CD9 (1D3, BD Biosciences).

[00384] Sangue periférico e baço: anti-camundongo FITC-K (187.1, BD Biosciences), PE- λ (RML-42, BioLegend), PeCy7-IgM (11/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-IgD (11-26c.2a, BioLegend), APC-CD3 (145-2C11, BD), A700-CD19 (1D3, BD), APC-eFluor780-B220 (RA3-6B2, eBioscience). Após incubação com os anticorpos marcados, as células foram lavadas e fixadas em formaldeído 2%. A aquisição de dados foi realizada em um citômetro de fluxo LSRII e os dados

analisados com FlowJo (Treestar, Inc.). Os resultados de um camundongo $H^{+}/\kappa^{+}/+$ e $H^{+}/A6^{res}\kappa^{+}/+$ representativo são mostrados nas FIGS. 14- 18.

[00385] Os resultados demonstram que células B de camundongos $H^{+}/A6^{res}\kappa^{+}/+$ progridem através dos estágios de desenvolvimento de células B de forma similar aos camundongos $H^{+}/\kappa^{+}/+$ na medula óssea e compartimentos periféricos, e mostram padrões normais de maturação após entrarem na periferia. Camundongos $H^{+}/A6^{res}\kappa^{+}/+$ demonstraram uma população aumentada de células $CD43^{int}CD19^{+}$, quando comparados com camundongos $H^{+}/\kappa^{+}/+$ (FIG. 16B). Isso pode indicar uma expressão de IgM acelerada pelo locus humanizado de cadeia pesada que contém um fragmento genômico ectópico de camundongo que compreende as sequências de ADAM6a e ADAM6b de camundongo em camundongos $H^{+}/A6^{res}\kappa^{+}/+$. Na periferia, as populações de células B e T de camundongos $H^{+}/A6^{res}\kappa^{+}/+$ parecem normais e similares aos camundongos $H^{+}/\kappa^{+}/+$.

[00386] Morfologia do testículo e caracterização do esperma. Para determinar se a infertilidade em camundongos que possuem loci humanizados variáveis de cadeia pesada de imunoglobulina é consequência de defeitos do testículo e/ou da produção de esperma, a morfologia do testículo e o conteúdo do esperma do epidídimo foram examinados.

[00387] Resumidamente, testículos de dois grupos ($n = 5$ por grupo; grupo 1: camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada e leve κ humanas, $H^{+}/\kappa^{+}/+$; grupo 2: camundongos heterozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e homozigotos para loci da cadeia leve κ do gene variável, $H^{+}/-\kappa^{+}/+$) foram dissecados

com o epidídimo intacto e pesados. Os espécimes foram então fixados, embebidos em parafina, cortados e corados com coloração com hematoxilina e eosina (HE). Cortes de testículo (2 testículos por camundongo, para um total de 20) foram examinados quanto a defeitos na morfologia e evidências de produção de esperma, enquanto cortes do epidídimo foram, examinados quanto à presença de esperma.

[00388] Nesse experimento, não foram observadas diferenças no peso ou na morfologia do testículo entre camundongos $H^{+}/+k^{+}/+$ e camundongos $H^{+}/-k^{+}/+$. O esperma foi observado em ambos os testículos e no epidídimo de todos os genótipos. Esses resultados estabelecem que a ausência de genes de ADAM6a e ADAM6b de camundongo não leva a alterações detectáveis na morfologia do testículo, e que o esperma é produzido em camundongos na presença e ausência desses dois genes. Os defeitos na fertilidade de camundongos-machos $H^{+}/+k^{+}/+$, portanto, provavelmente não são causados por baixa produção de esperma.

[00389] Motilidade e migração do esperma. Camundongos que não possuem outros membros da família do gene de ADAM são inférteis em consequência de defeitos na motilidade ou migração do esperma. A migração do esperma é definida como a habilidade do esperma para passar do útero para dentro do oviduto, e é normalmente necessária à fertilização em camundongos. Para determinar se a deleção de ADAM6a e ADAM6b de camundongo afeta esse processo, a migração e motilidade do esperma foram avaliadas em camundongos $H^{+}/+k^{+}/+$.

[00390] Resumidamente, esperma foi obtido de testículos de (1) camundongos heterozigotos para loci do gene variável

da cadeia pesada humana e homozigotos para cadeia leve κ humana loci do gene variável ($H^{+/-\kappa^{+}/+}$); (2) camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e homozigotos para cadeia leve κ humana loci do gene variável ($H^{+/+\kappa^{+}/+}$); (3) camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada humana e homozigotos para cadeia leve κ do tipo selvagem ($H^{+/+m_{\kappa}}$); e, (4) camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (WT). Não foram observadas anormalidades significantes na contagem do esperma ou na motilidade global do esperma por inspeção. Para todos os camundongos, foi observada dispersão do cúmulo, indicando que cada amostra de esperma era capaz de penetrar nas células do cúmulo e se ligar à zona pelúcida *in vitro*. Esses resultados estabelecem que camundongos $H^{+/+\kappa^{+}/+}$ possuem esperma que são capazes de penetrar no cúmulo e se ligar à zona pelúcida.

[00391] A fertilização de óvulos de camundongo *in vitro* (IVF) foi feita usando esperma de camundongos como descrito acima. Um número ligeiramente menor de embriões clivados foi observado para camundongos $H^{+/+\kappa^{+}/+}$ no dia seguinte IVF, bem como um número reduzido de esperma ligado aos óvulos. Esses resultados estabelecem que o esperma de camundongos $H^{+/+\kappa^{+}/+}$, uma vez exposto a um óvulo, são capazes de penetrar no cúmulo e se ligar à zona pelúcida.

[00392] Em outro experimento, a habilidade do esperma de camundongos $H^{+/+\kappa^{+}/+}$ para migrar do útero e através do oviduto foi determinada em um ensaio de migração de esperma.

[00393] Resumidamente, um primeiro grupo de camundongos-fêmeas superovulados ($n = 5$) acasalaram com

machos H⁺/+κ⁺/+ (n = 5) e um segundo grupo de camundongos-fêmeas superovulados (n = 5) foram acasalados com machos H⁺/-κ⁺/+ males (n = 5). Os pares de cruzamento foram observados quanto à copulação, e cinco a seis horas pós-copulação o útero e oviduto em anexo de todas as fêmeas foram removidos e enxaguados para análise. As soluções de enxágue foram verificadas quanto à presença de óvulos para verificar a ovulação e obter uma contagem de esperma. A migração do esperma foi avaliada de duas formas diferentes. Primeiro, ambos os ovidutos foram removidos do útero, enxaguados com solução salina, e quaisquer espermatozoides identificados foram contados. A presença de óvulos também era observada como evidência de ovulação. Segundo, ovidutos foram deixados anexados ao útero e ambos os tecidos foram fixados, embebidos em parafina, cortados e corados (como descrito acima). Os cortes foram examinados quanto à presença de esperma, no útero e em ambos os ovidutos.

[00394] Para as fêmeas que acasalaram com os cinco machos H⁺/+κ⁺/+, muito pouco esperma foi encontrado na solução de enxágue do oviduto. As soluções de enxágue de ovidutos das fêmeas que acasalaram com os machos H⁺/-κ⁺/+ exibiu um nível de esperma cerca de 25 a 30 vezes maior (média, n = 10 ovidutos) do que presentes em soluções de enxágue dos ovidutos das fêmeas que acasalaram com os machos H⁺/+κ⁺/+. Uma comparação de procriação representativa de camundongos H⁺/+κ⁺/+ e H⁺/+A6resκ⁺/+ é mostrada na Tabela 9.

[00395] Cortes histológicos de útero e oviduto foram preparados. Os cortes foram examinados quanto à presença de esperma no útero e no oviduto (o colliculus tubarius). A

inspeção de cortes histológicos de oviduto e útero revelou que para camundongos-fêmeas cruzados com camundongos H⁺/+k⁺/+, o esperma foi encontrado no útero, mas não no oviduto. Além disso, cortes de fêmeas cruzadas com camundongos H⁺/+k⁺/+ revelaram que o esperma não era encontrado na junção útero-tubária (UTJ). Em cortes de fêmeas acasaladas com camundongos H⁺/-k⁺/+, o esperma foi identificado na UTJ e no oviduto.

[00396] Esses resultados estabelecem que camundongos que não possuem os genes de ADAM6a e ADAM6b produzem esperma que exibe um defeito de migração *in vivo*. Em todos os casos, o esperma foi observado dentro do útero, indicando que a copulação e a liberação de esperma aparentemente ocorrem como normalmente, mas pouco ou nenhum esperma foi observado dentro dos ovidutos após copulação, como medido pela contagem de esperma ou observação histológica. Esses resultados estabelecem que camundongos que não possuem genes de ADAM6a e ADAM6b produzem esperma que exibe uma incapacidade para migrar do útero para o oviduto. Esse defeito aparentemente leva à infertilidade, pois o esperma são incapazes de atravessar a junção uterina-túbulo no oviduto, enquanto os óvulos são fertilizados. Considerados em conjunto, todos esses resultados convergem para apoiar a hipótese de que genes de ADAM6 de camundongo ajudam a dirigir o esperma com motilidade normal para migrar para fora do útero, através da junção útero-tubária e do oviduto e, dessa forma, abordar um óvulo para obter o evento de fertilização. O mecanismo pelo qual ADAM6 obtém isso pode ser dirigido por uma ou ambas as proteínas ADAM6, ou por meio da expressão

coordenada com outras proteínas, por exemplo, outras proteínas ADAM, na célula do esperma, como descrito abaixo.

Tabela 9

Genótipo macho	Animais em procriação (machos/fêmeas)	Duração da procriação	Ninhada	Prole
H ^{+/+} K ^{+/+}	6/6	6 meses	2	25
H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	4/8	4 meses	4	198

[00397] Expressão da do gene de ADAM. Um complexo de proteínas ADAM sabidamente está presente como um complexo na superfície do esperma em maturação. Camundongos que não possuem outros membros da família do gene de ADAM perdem esse complexo à medida que o esperma amadurece, e exibem uma redução de múltiplas proteínas ADAM no esperma maduro. Para determinar se uma ausência de genes de ADAM6a e ADAM6b afeta outras proteínas ADAM de forma similar, *Western blots* de extratos de proteína do testículo (esperma imaturo) e epidídimo (esperma em maturação) foram analisados para determinar os níveis de expressão de outros membros da família do gene de ADAM.

[00398] Nesse experimento, foram analisados extratos de proteína dos grupos (n = 4 por grupo) de camundongos H^{+/+}K^{+/+} e H^{+/+}-K^{+/+}. Os resultados mostraram que a expressão de ADAM2 e ADAM3 não era afetada em extratos de testículo. No entanto, tanto ADAM2 quanto ADAM3 estavam dramaticamente reduzidos em extratos do epidídimo. Isso demonstra que a ausência de ADAM6a e ADAM6b no esperma de camundongos H^{+/+}K^{+/+} pode ter um efeito direto sobre a expressão e talvez sobre a função de outras proteínas ADAM à medida que o

esperma amadurece (por exemplo, ADAM2 e ADAM3). Isso sugere que ADAM6a e ADAM6b são parte de um complexo de proteína ADAM na superfície do esperma, o que pode ser crucial para a migração adequada do esperma.

Exemplo 9

Utilização do gene variável da cadeia pesada humana em camundongos de resgate de ADAM6

[00399] O uso selecionado do gene variável da cadeia pesada humana foi determinado para camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada e leve κ humanas que não possuem os genes de ADAM6a e ADAM6b de camundongo ($H^{+}/\kappa^{+}/+$) ou que contêm um fragmento genômico ectópico que codifica genes de ADAM6a e ADAM6b de camundongo ($H^{+}/A6^{res}\kappa^{+}/+$) por um ensaio de PCR quantitativa usando sondas TAQMAN™ (como descrito acima).

[00400] Resumidamente, células B CD19⁺ foram purificadas dos baços de camundongos $H^{+}/\kappa^{+}/+$ e $H^{+}/A6^{res}\kappa^{+}/+$ usando microglóbulos de camundongo CD19 (Miltenyi Biotec) e RNA total foi purificado usando o Mini kit RNEASY™ (Qiagen). RNA genômico foi removido usando um tratamento em coluna DNase sem RNase (Qiagen). Cerca de 200 ng de mRNA foram transcritos de forma reversa em cDNA usando o kit de síntese "First Stand cDNA" (Invitrogen) e depois amplificados com o Universal PCR Master Mix TAQMAN™ (Applied Biosystems) usando o sistema de detecção de sequência ABI 7900 (Applied Biosystems). A expressão relativa de cada gene foi normalizada para a expressão de região constante da cadeia leve κ de camundongo (mC κ). A Tabela 10 apresenta as combinações de sondas senso/anti-senso/TAQMAN™ MGB usadas nesse experimento.

Tabela 10

VH humana	Sequência (5'-3')	ID. DE SEQ. N°:
VH6-1	Senso: CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA	6
	Anti-Senso: GGAGATGGCACAGGTGAGTGA	7
	Sonda: TCCAGGACTGGTGAAGC	8
VH1-2	Senso: TAGTCCCAGTGATGAGAAAGAGAT	9
	Anti-senso: GAGAACACAGAAGTGGATGAGATC	10
	Sonda: TGAGTCCAGTCCAGGGA	11
VH ₃ -23	Senso: AAAAATTGAGTGTGAATGGATAAGAGTG	12
	Anti-senso: AACCTGGTCAGAACTGCCA	13
	Sonda: AGAGAAACAGTGGATACGT	14
VH1-69	Senso: AACTACGCACAGAAGTTCCAGG	15
	Anti-senso: GCTCGTGGATTTGTCCGC	16
	Sonda: CAGAGTCACGATTACC	17
mCK	Senso: TGAGCAGCACCCCTCACGTT	18
	Anti-senso: GTGGCCTCACAGGTATAGCTGTT	19
	Sonda: ACCAAGGACGAGTATGAA	20

[00401] Nesse experimento, a expressão de todos os quatro genes de V_H humana foi observada nas amostras analisadas. Além disso, os níveis de expressão eram comparáveis entre camundongos H^{+/+}K^{+/+} e H^{+/+}A6^{res}K^{+/+}. Esses resultados demonstram que os genes de V_H humana que eram tanto distais ao sítio de modificação (VH3-23 e VH1-69) e proximais ao sítio de modificação (VH1-2 e VH6-1) eram, todos, capazes de recombinar para formar um cadeia pesada humana funcionalmente expressa. Esses resultados demonstram que o fragmento genômico ectópico que compreende sequências de ADAM6a e ADAM6b de camundongo inseridas em uma sequência genômica da cadeia pesada humana não afeta a recombinação

V(D)J de segmentos do gene da cadeia pesada humana dentro do locus, e esses camundongos são capazes de recombinar segmentos do gene da cadeia pesada humana de forma normal para produzir proteínas de imunoglobulina da cadeia pesada funcionais.

Exemplo 10

Resposta imune humoral em camundongos de resgate de ADAM6

[00402] Foi determinada a resposta imune humoral para camundongos homozigotos para loci do gene variável da cadeia pesada e leve κ humanas que não possuem genes de ADAM6a e ADAM6b de camundongo ($H^+ + \kappa^{+/+}$) ou que contêm um fragmento genômico ectópico que codifica genes de ADAM6a e ADAM6b de camundongo ($H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$) por um esquema de imunização multiantígenos, seguida por isolamento e caracterização do anticorpo. Os resultados foram comparados para determinação de qualquer efeito sobre a recombinação V(D)J envolvendo os segmentos do gene de imunoglobulina humana, avaliação da progressão da titulação sérica, produção de anticorpos por hibridomas e afinidade por antígeno.

[00403] Protocolo de imunização. Um receptor da superfície celular humano (Antígeno A), um anticorpo humano específico para um receptor tirosina-proteína quinase humano (Antígeno B), uma proteína humana secretada que funciona na regulação da via de sinalização de TGF- β (Antígeno C), e um receptor tirosina quinase humano (Antígeno D) foram empregados para imunizações comparativas em grupos de camundongos. O soro foi coletado de grupos de camundongos antes da imunização com os antígenos acima. Cada antígeno (2,3 μ g cada) foi administrado em uma

imunização de sensibilização inicial misturado com 10 µg de oligonucleotídeo CpG como adjuvante (Invivogen). O imunógeno foi administrado no coxim da pata (f.p.) em um volume de 25 µl por camundongo. Subsequentemente, os camundongos foram reforçados via f.p. com 2,3 µg de antígeno, juntamente com 10 µg de CpG e 25 µg de Adju-Phos (Brenntag) como adjuvantes nos dias 3, 6, 11, 13, 17 e 20, por um total de seis reforços. Os camundongos foram sangrados nos dias 15 e 22 após o quarto e sexto reforços, respectivamente, e anti-soros foram testados quanto à titulação de anticorpo para cada antígeno específico.

[00404] As titulações de anticorpo foram determinadas em soros de camundongos imunizados usando um ensaio ELISA. Placas de microtitulação de 96 poços (Thermo Scientific) foram revestidas com o respectivo antígeno (2 µg/ml) em solução salina tamponada com fosfato (PBS, Irvine Scientific) de um dia para o outro a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato contendo Tween 20 0,05% (PBS-T, Sigma-Aldrich) quatro vezes usando uma lavadora de placas (Molecular Devices). As placas foram então bloqueadas com 250 µl de albumina sérica bovina 0,5% (BSA, Sigma-Aldrich) em PBS e incubadas por uma hora em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas quatro vezes com PBS-T. Soros de camundongos imunizados e soros pré-ímmes foram diluídos serialmente três vezes em BSA-PBS 0,5% começando a 1:300 ou 1:1000 e adicionados às placas bloqueadas em duplicata e incubadas por uma hora em temperatura ambiente. Os dois últimos poços foram deixados vazios para serem usados como controle de anticorpo secundário. As placas foram novamente

lavadas quatro vezes com PBS-T em uma lavadora de placas. Uma diluição de 1:5.000/1:10.000 de anti-IgG de camundongo Fc cabra-peroxidase de raiz-forte (HRP, Jackson ImmunoResearch) ou anti-IgG de camundongo-kappa de cabra-HRP (Southern Biotech) conjugado a anticorpo secundário foi adicionada às placas e incubada por uma hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente oito vezes com PBS-T e desenvolvidas usando TMB/H₂O₂ como substrato. O substrato foi incubado por vinte minutos e a reação interrompida com H₂SO₄ 2 N (VWR) ou H₃PO₄ 1 N (JT Baker). As placas foram lidas em um espectrofotômetro (Victor, Perkin Elmer) a 450 nm. As titulações de anticorpo foram calculadas usando o software Graphpad PRISM.

[00405] A titulação sérica foi calculada como diluição de soro dentro da faixa de titulação experimental no sinal de ligação de antígeno equivalente a duas vezes acima do nível de fundo. Os resultados para a resposta imune humoral são mostrados na FIG. 19 (Antígeno A), FIG. 20 (Antígeno B), FIG. 21 (Antígeno C), e FIG. 22 (Antígeno D). A pontuação positiva de antígeno de hibridomas feitos usando dois baços isolados de camundongos de cada grupo de imunizações selecionadas é mostrada na Tabela 11 (pontuação de antígeno score é igual a 2X/nível de fundo).

[00406] Como mostrado nesse Exemplo, as titulações de anticorpo geradas em camundongos de resgate de ADAM6 (H⁺/A6^{resK}+/+) eram comparáveis com aquelas geradas em camundongos desprovidos de ADAM6a e ADAM6b e que possuem cadeia pesada humanizada (H⁺/k⁺/+). Além disso, baços de camundongos H⁺/A6^{resK}+/+ geraram hibridomas antígeno-positivos para todos os antígenos testados, incluindo

anticorpos de afinidade elevada, em níveis comparáveis com camundongos $H^{+}/K^{+}/+$. Dessa forma, acredita-se que não exista defeito na recombinação V(D)J de segmentos do gene de imunoglobulina humana em camundongos de resgate de ADAM6, considerando a produção de anticorpos com afinidade elevada que contêm genes de imunoglobulina humana.

Tabela 11

Antígeno	Cepa de camundongo	Pontuação de antígeno
A	$H^{+}/A6^{resK^{+}}/+$	76
A	$H^{+}/A6^{resK^{+}}/+$	32
B	$H^{+}/K^{+}/+$	4
B	$H^{+}/K^{+}/+$	12
B	$H^{+}/A6^{resK^{+}}/+$	41
B	$H^{+}/A6^{resK^{+}}/+$	95

Exemplo 1

Determinação da afinidade de ligação de antígeno

[00407] As afinidades de ligação de anticorpos que mostram ligação específica ao Antígeno B foram avaliadas usando um biossensor de ressonância de plasmônio de superfície em tempo real (BIAcore 2000). Meios condicionados de hibridomas isolados de duas cepas de camundongos imunizados com Antígeno B ($H^{+}/K^{+}/+$ e $H^{+}/A6^{resK^{+}}/+$) foram usados durante a avaliação BIAcore. A superfície sensora do BIAcore foi primeiro derivatizada com anticorpo policlonal anti-camundongo de coelho (GE) para capturar anticorpos anti-Antígeno B de meios condicionados. Durante todo o método de avaliação, HBST (0,01 M de HEPES pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005% v/v de Tensoativo P20) foi usado como o tampão de processamento. O fragmento Fab

de Antígeno B foi injetado sobre a superfície que capturou anticorpo anti-Antígeno B em uma taxa de fluxo de 50 µl/minuto em uma concentração de 100 nM. A associação anticorpo-antígeno foi monitorada por três minutos, enquanto a dissociação de antígeno do anticorpo capturado era monitorada por cinco minutos em tampão de processamento HBST. O experimento foi realizado a 25°C. As constantes de associação cinética (k_a) e da taxa de dissociação (k_d) foram determinadas por processamento e ajuste dos dados a um modelo de ligação 1:1 usando o software de ajuste de curva Scrubber 2.0. As constantes do equilíbrio de dissociação de ligação (K_D) e as meias-vidas dissociativas ($T_{1/2}$) foram calculadas a partir das constantes da taxa cinética como: K_D (M) = k_d / k_a ; e $T_{1/2}$ (min) = $(\ln 2 / (60 * k_d))$. Resultados para anticorpos anti-Antígeno B selecionados são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12

Anticorpo	Cepa de camundongo	K_D (M)	$T_{1/2}$ (min)
5D6	H ^{+/+} K ^{+/+}	1,62E-08	3
8G10	H ^{+/+} K ^{+/+}	1,20E-08	5
10F10	H ^{+/+} K ^{+/+}	1,09E-08	3
1F5	H ^{+/+} K ^{+/+}	1,00E-07	0.3
10G8	H ^{+/+} K ^{+/+}	1,47E-07	0.3
1B11	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	1,98E-08	6
2D9	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	9,40E-10	51
4D11	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	5,60E-08	0.8
6C5	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	1,10E-09	188
6F4	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	1,35E-08	3

7C4	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	2,00E-06	0.05
8G12	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	2,31E-09	19
9B12	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	3,47E-09	13
10B4	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	3,60E-09	23
11E7	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	3,06E-08	2
11E12	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	2,70E-07	0.1
1E4	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	7,00E-10	58
4D2	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	5,80E-10	150
5H6	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	2,60E-09	3
5H10	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	6,00E-09	70
9A9	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	3,80E-09	12
11C11	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	1,55E-09	38
12C10	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	5,90E-09	16
12G7	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	9,00E-08	7
12G9	H ^{+/+} A6 ^{res} K ^{+/+}	3,32E-09	12

[00408] Em um experimento similar, a cinética de diferentes anticorpos monoclonais presentes em hibridomas condicionados que se ligam ao Antígeno A foi determinada usando um ensaio de biossensor de ressonância de plasmônio de superfície em tempo real (BIAcore 4000). Todos os clones de hibridoma usados nesse ensaio foram produzidos em camundongos H^{+/+}A6^{res}K^{+/+}.

[00409] Resumidamente, para capturar os anticorpos Antígeno A-específicos, anticorpo policlonal de coelho anti- camundongo (Catálogo GE * BR-1008-38) primeiro foi imobilizado no chip sensor. A avaliação BIAcore foi realizada em dois tampões diferentes - PBSP, pH 7,2 e PBSP, pH 6,0. Ambos os tampões foram suplementados com 0,1 mg/ml

de BSA. Após a captura de anticorpos anti-Antígeno A pelos meios condicionados, 1 μ M de monômero de Antígeno A (preparado no respectivo tampão de processamento) foi injetado sobre a superfície do anticorpo capturado por 1,5 minuto a 30 μ l/minuto e a dissociação de monômero de Antígeno A ligado foi monitorada por 1,5 minuto no respectivo tampão de processamento a 25°C. As constantes da taxa de associação cinética (k_a) e da taxa de dissociação (k_d) foram determinadas por processamento e ajuste dos dados a um modelo de ligação 1:1 usando o software de ajuste de curva Scrubber 2.0. As constantes do equilíbrio de dissociação de ligação (K_D) e as meias-vidas dissociativas ($T_{1/2}$) foram calculadas a partir das constantes da taxa cinética como: K_D (M) = k_d / k_a ; e $T_{1/2}$ (min) = $(\ln 2 / (60 * k_d))$. A Tabela 13 apresenta os parâmetros da cinética de ligação para anticorpo anti-Antígeno A selecionado que se liga ao monômero de Antígeno A a pH 7,2 e pH 6,0. NB: nenhuma ligação detectada sob as condições experimentais atuais.

Tabela 13

Anticorpo	pH 7,2		pH 6,0	
	KD (M)	T _{1/2} (min)	KD (M)	T _{1/2} (min)
1D7	3,89E-10	25	9,45E-10	17
2B4	NB	NB	NB	NB
2B7	3,90E-09	1.2	2,98E-09	2
2F7	2,36E-10	144	2,06E-11	1882
3A7	NB	NB	6,42E-10	17
3F6	NB	NB	NB	NB
4A6	1,91 E-09	2	2,12E-09	2

4C4	NB	NB
4E12	2,69E-10	16
5C11	1,68E-09	3
5D10	NB	NB
5E7	NB	NB
5F10	NB	NB
5F11	8,18E-10	8
5G4	3,55E-10	15
5G9	6,39E-10	15
5H8	4,73E-10	15
6D2	NB	NB
6D3	2,88E-10	14
6E4	NB	NB
6E6	1,37E-09	10
6H6	NB	NB
7A12	NB	NB
7C3	NB	NB
7E8	4,38E-10	22
7F10	NB	NB
7G9	NB	NB
8B8	NB	NB
8B11	NB	NB
8C3	NB	NB
8E9	NB	NB
8G3	NB	NB
8H ₃	NB	NB
8H4	3,70E-07	0.1
8H8	NB	NB
1A8	2,30E-09	4

NB	NB
2,03E-10	18
2,31 E-09	3
4,56E-09	2
NB	NB
NB	NB
6,79E-10	7
7,42E-11	53
4,31E-10	21
NB	NB
NB	NB
8,82E-11	39
2,67E-09	4
1,30E-09	14
NB	NB
NB	NB
NB	NB
2,63E-10	34
NB	NB
NB	NB
NB	NB
NB	NB
NB	NB
NB	NB
NB	NB
NB	NB
NB	NB
7,40E-10	6

1B6	NB	NB
106	NB	NB
1012	NB	NB
1D2	NB	NB
1E2	1,17E-09	42
1E3	5,05E-10	89
1E6	1,97E-08	3
1E9	1,14E-09	30
1H6	2,93E-09	14
2H9	2,30E-08	2
3A2	1,15E-10	44
3A4	1,70E-10	31
3D11	NB	NB
3H10	2,82E-09	20
4B6	7,79E-10	6
4H6	9,18E-11	62
5A2	NB	NB
5C5	8,71E-11	49
5F6	6,16E-11	114

NB	NB
NB	NB
NB	NB
NB	NB
3,08E-09	29
8,10E-10	57
1,84E-08	3
1,14E-09	25
9,87E-10	25
1,91E-08	2
1,25E-10	33
1,44E-10	30
1,58E-08	1
2,59E-09	15
6,36E-10	7
1,20E-10	43
7,04E-10	12
7,02E-11	48
5,46E-11	121

[00410] Como mostrado acima, anticorpos de alta afinidade foram obtidos de camundongos $H^{+}/A6^{resK^{+}/+}$ e $H^{+}/K^{+}/+$ de uma forma comparável. Entre os vinte e cinco anticorpos representados na Tabela 12, vinte produzidos em camundongos $H^{+}/A6^{resK^{+}/+}$ demonstraram uma faixa de afinidade de 0,5 nM a 1 μ M, enquanto os cinco gerados em camundongos $H^{+}/K^{+}/+$ demonstraram uma faixa de afinidade de 10 nM a 150 nM. Além disso, os vinte e cinco anticorpos mostrados na Tabela 13 demonstraram uma faixa de afinidade de 20 pM a 350 nM para ligação ao monômero de Antígeno A.

[00411] Como demonstrado nesse Exemplo, a reinserção de genes de ADAM6 de camundongo em um locus humanizado de cadeia pesada de imunoglobulina não prejudica a habilidade do camundongo para montar uma resposta imune robusta a múltiplos antígenos, caracterizada por repertórios de anticorpos humanos que possuem afinidades diversas na faixa subnanomolar, que são derivados de segmentos gênicos humanos rearranjados a partir de uma linhagem germinativa modificada geneticamente.

REIVINDICAÇÕES

1. Método *ex vivo* para produzir um camundongo geneticamente modificado pela inserção de um gene *Adam6* **caracterizado** pelo fato de ser através da modificação genética de uma célula de camundongo *ex vivo* para obter:

a) inserção ectópica de um gene *Adam6* que é funcional em camundongo macho, e

b) locus modificado da região variável de cadeia pesada de imunoglobulina.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a modificação reduz ou elimina a atividade do *Adam6* de uma célula ou tecido de um camundongo macho.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o gene *Adam6* está presente no locus modificado da região variável da cadeia pesada.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o gene *Adam6* está presente em uma posição outra do que o locus modificado da região variável da cadeia pesada.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o gene *Adam6* inclui o gene de camundongo *Adam6a* (SEQ ID NO: 1) e/ou o gene de camundongo *Adam6b* (SEQ ID NO: 2).

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o locus modificado da região variável de cadeia pesada de imunoglobulina compreende uma inserção de um ou mais segmentos de gene humano V_H , ou um ou mais segmentos de gene humano D_H , um ou mais segmentos de gene humano J_H .

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que um ou mais segmentos de gene V_H incluem pelo menos 18, pelo menos 39, ou pelo menos 80 segmentos de gene V_H humano.

8. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que o locus modificado da região variável de cadeia pesada de imunoglobulina compreende pelo menos 18 segmentos de gene V_H humano, pelo menos 1 e no máximo 27 segmentos de gene D_H humano e pelo menos 1 e no máximo 6 segmentos de gene J_H humano.

9. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que o locus modificado da região variável de cadeia pesada de imunoglobulina compreende pelo menos 39 segmentos de gene V_H humano, pelo menos 1 e no máximo 27 segmentos de gene D_H humano e pelo menos 1 e no máximo 6 segmentos de gene J_H humano.

10. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que o locus modificado da região variável de cadeia pesada de imunoglobulina compreende 80 segmentos de gene V_H humano, pelo menos 1 e no máximo 27 segmentos de gene D_H humano e pelo menos 1 e no máximo 6 segmentos de gene J_H humano.

11. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que um ou mais segmentos de gene V_H humano, um ou mais segmentos de gene D_H humano, e um ou mais segmentos de gene J_H humano estão operavelmente conectados a um gene de região constante.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que o gene de região constante é um gene de região constante de camundongo.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o gene de região constante de camundongo compreende uma região constante selecionado dentre CH₁, uma junção, CH₂, CH₃ e/ou CH₄ ou ainda uma combinação dentre eles.

14. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que compreende um ou mais segmentos de gene V_κ humano, e um ou mais segmentos de gene J_κ humano.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que um ou mais segmentos de gene V_κ humano e um ou mais segmentos de gene J_κ humano estão presentes em um locus endógeno de cadeia leve κ de imunoglobulina.

16. Método *ex vivo* para produzir um anticorpo específico para um antígeno de interesse **caracterizado** por cultivar *ex vivo* pelo menos uma célula de um camundongo produzido pelo método, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, que tenha sido imunizado com o antígeno, produzindo assim um anticorpo específico contra o antígeno.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que o cultivo da célula isolada que produz o anticorpo específico é realizado em pelo menos uma célula de hibridoma gerada a partir de pelo menos uma célula.

18. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que a célula que produz o anticorpo específico foi obtida a partir do referido camundongo imunizado com proteína, DNA, uma combinação de

DNA e proteínas, ou células expressando o antígeno.

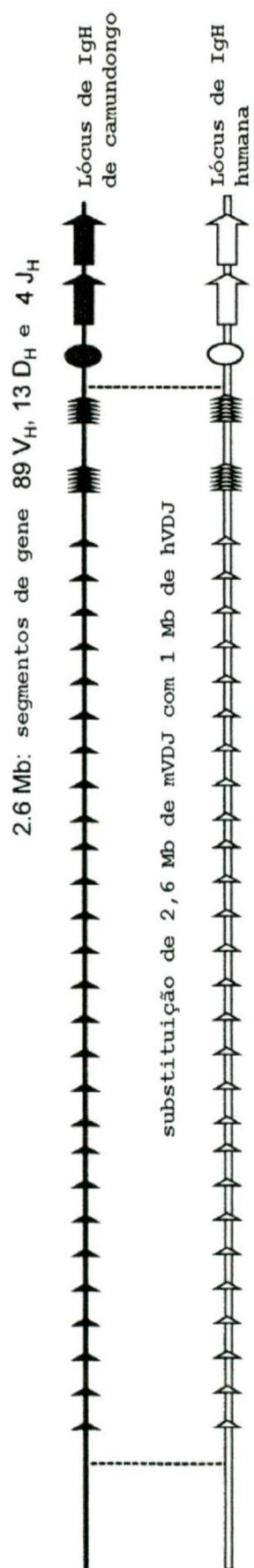


FIG. 1A

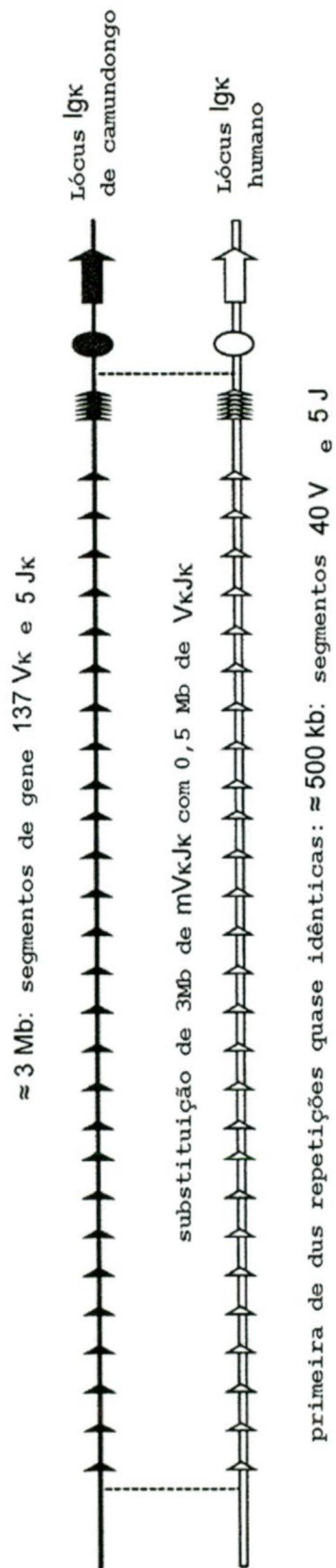


FIG. 1B

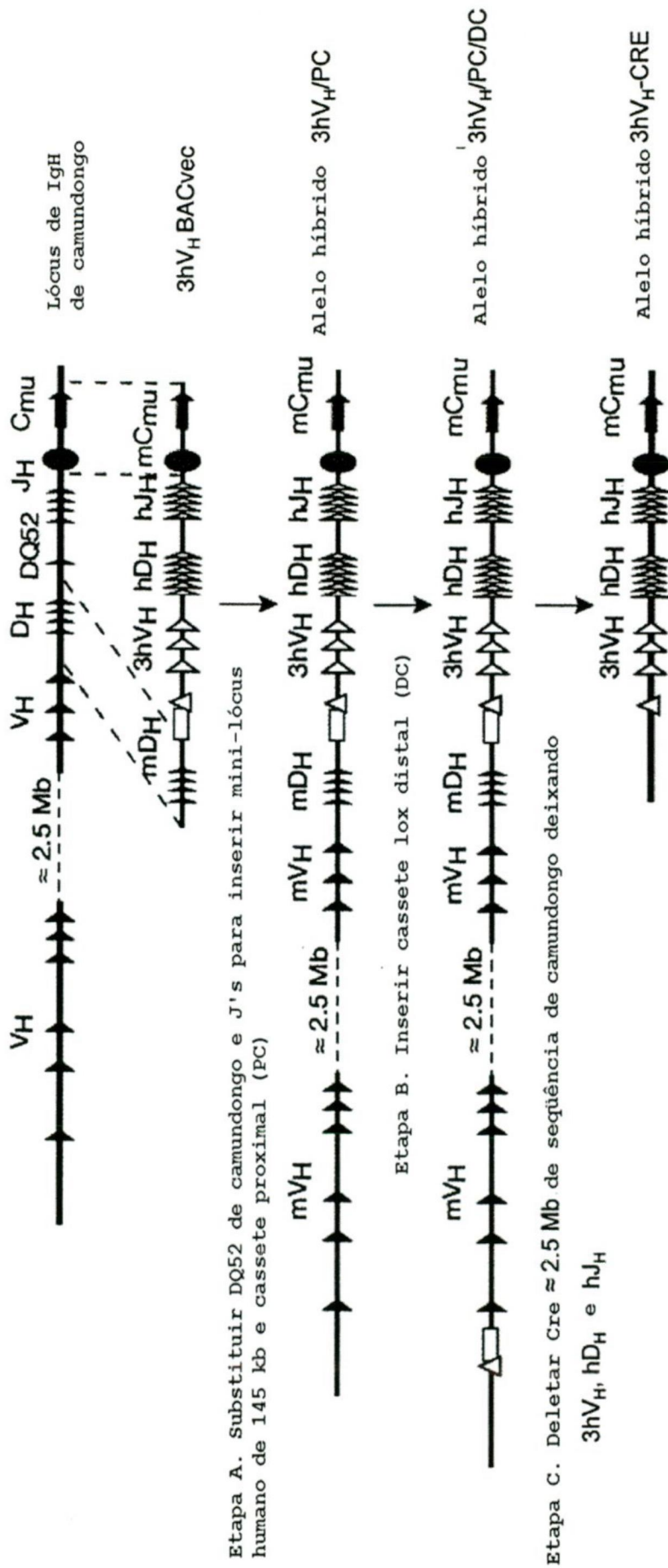


FIG. 2A

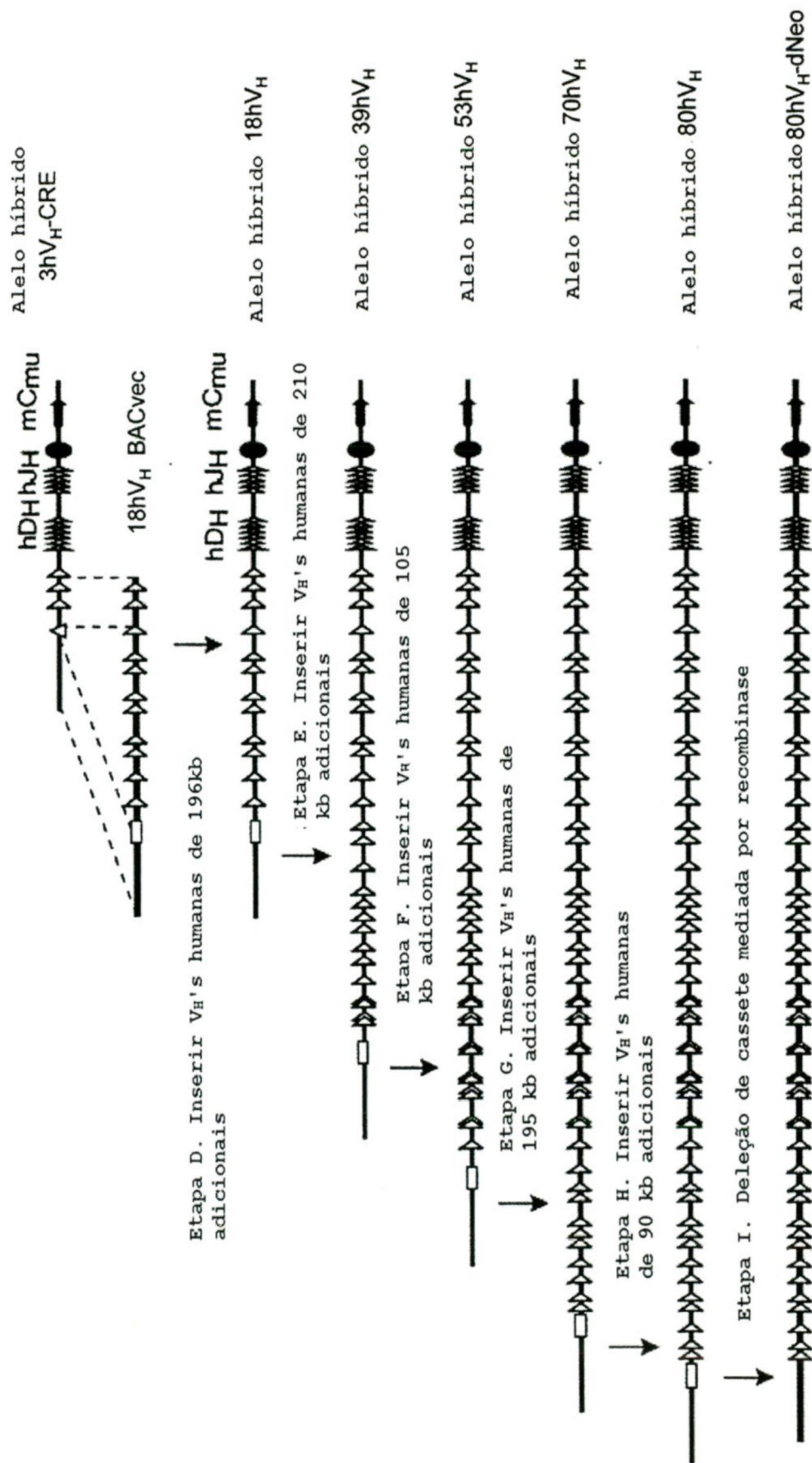


FIG. 2B

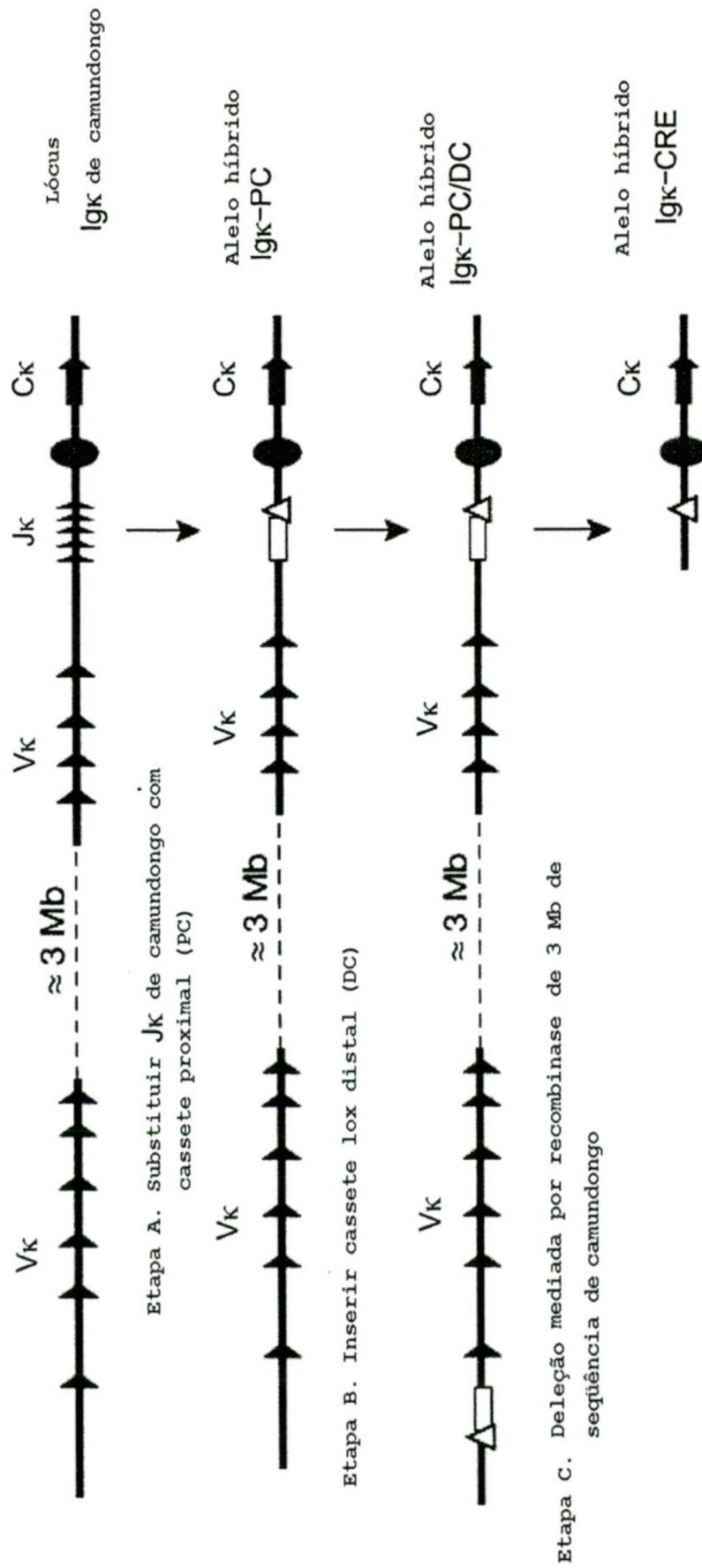


FIG. 2C

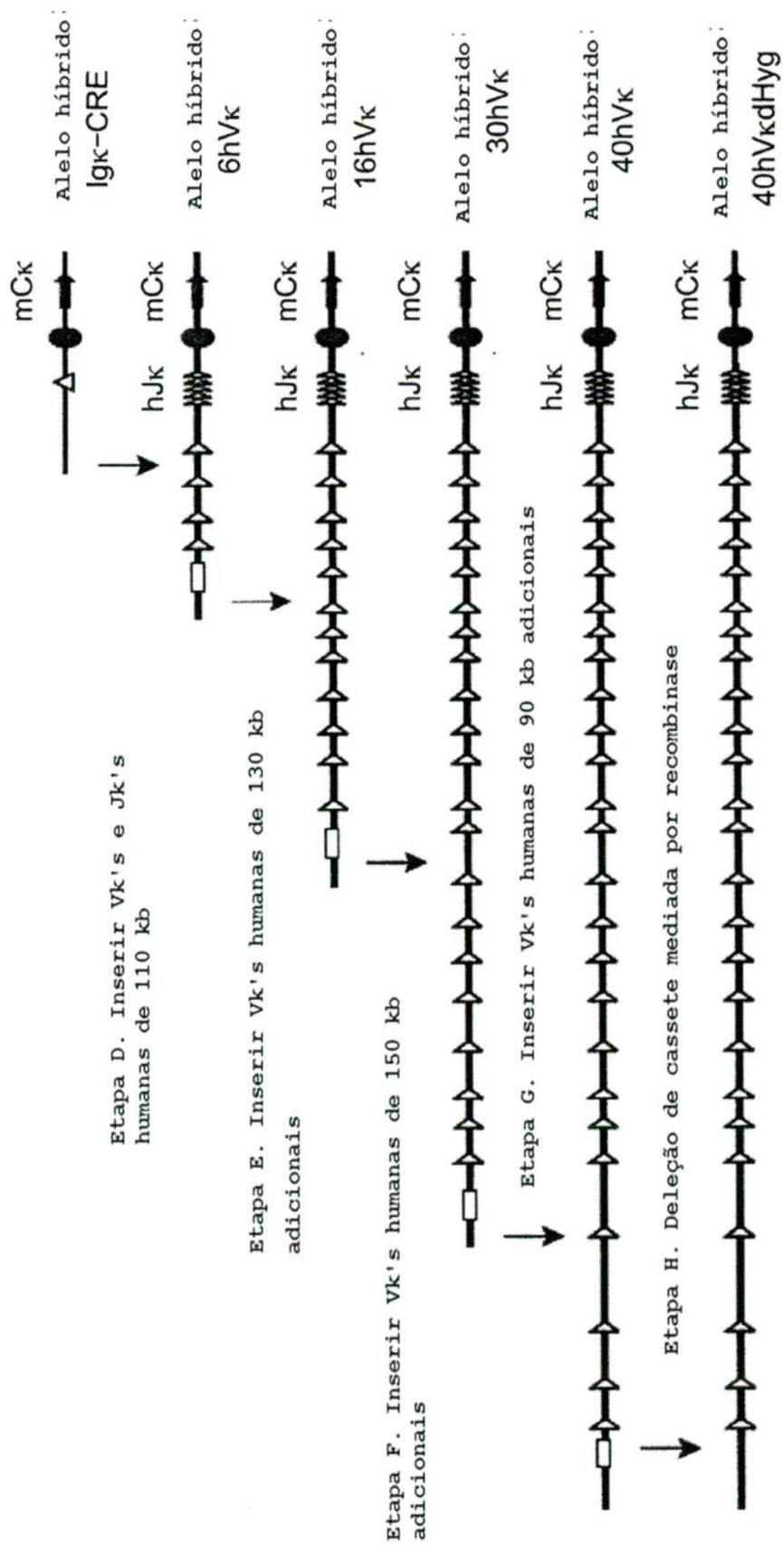


FIG. 2D

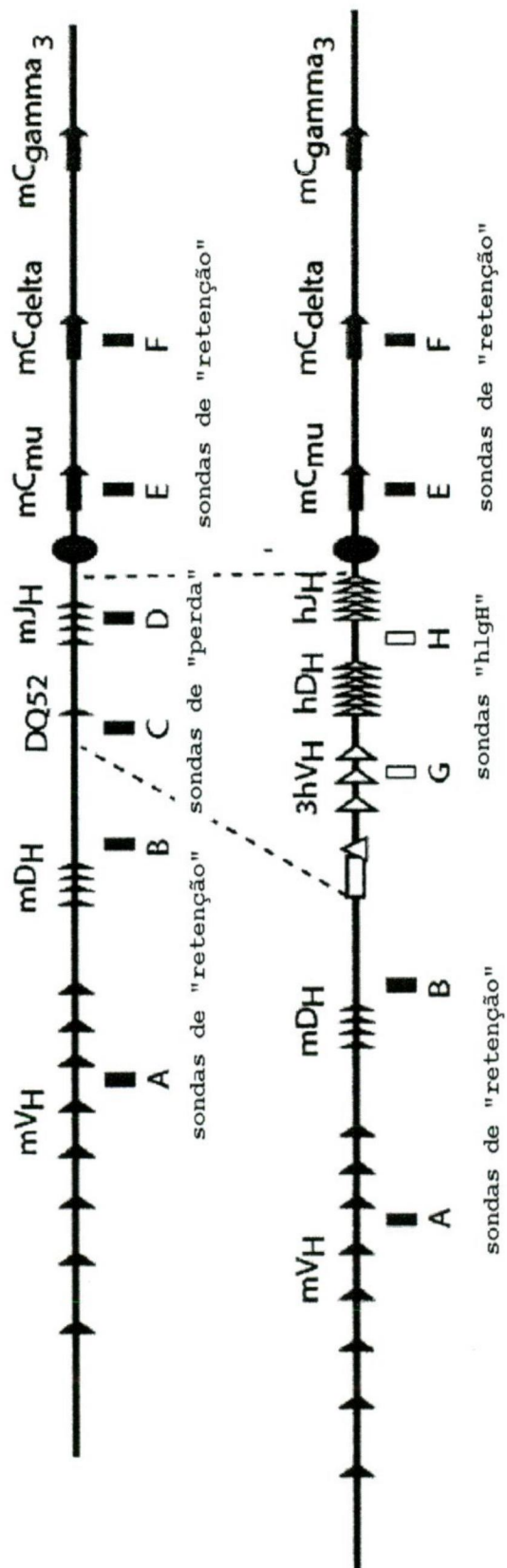


FIG. 3A

		A	B	C	D	E	F	G	H
ES Parenteral	Número de cópia teórico	2	2	2	2	2	2	0	0
	Número de cópia observado	1.9	1.8	2.1	1.8	1.9	1.8	<0.01	<0.04
ES Modificado	Número de cópia teórico	2	2	1	1	2	2	1	1
	Número de cópia observado	1.9	2.4	1.0	1.0	2.0	1.9	+	+

FIG. 3B

	copy number	D	H
Camundongo WT	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
Camundongo 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
Camundongo 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

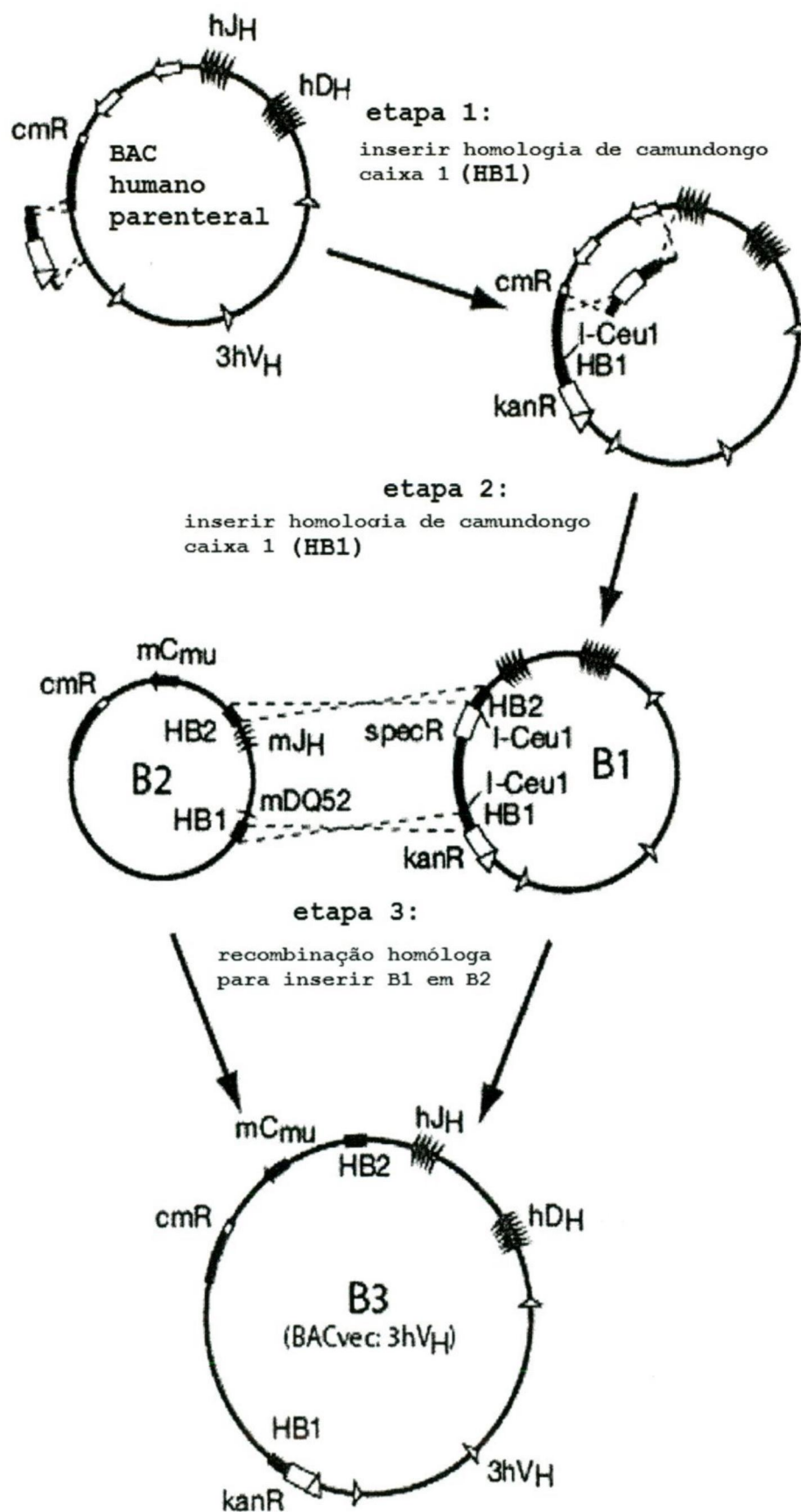


FIG. 4A

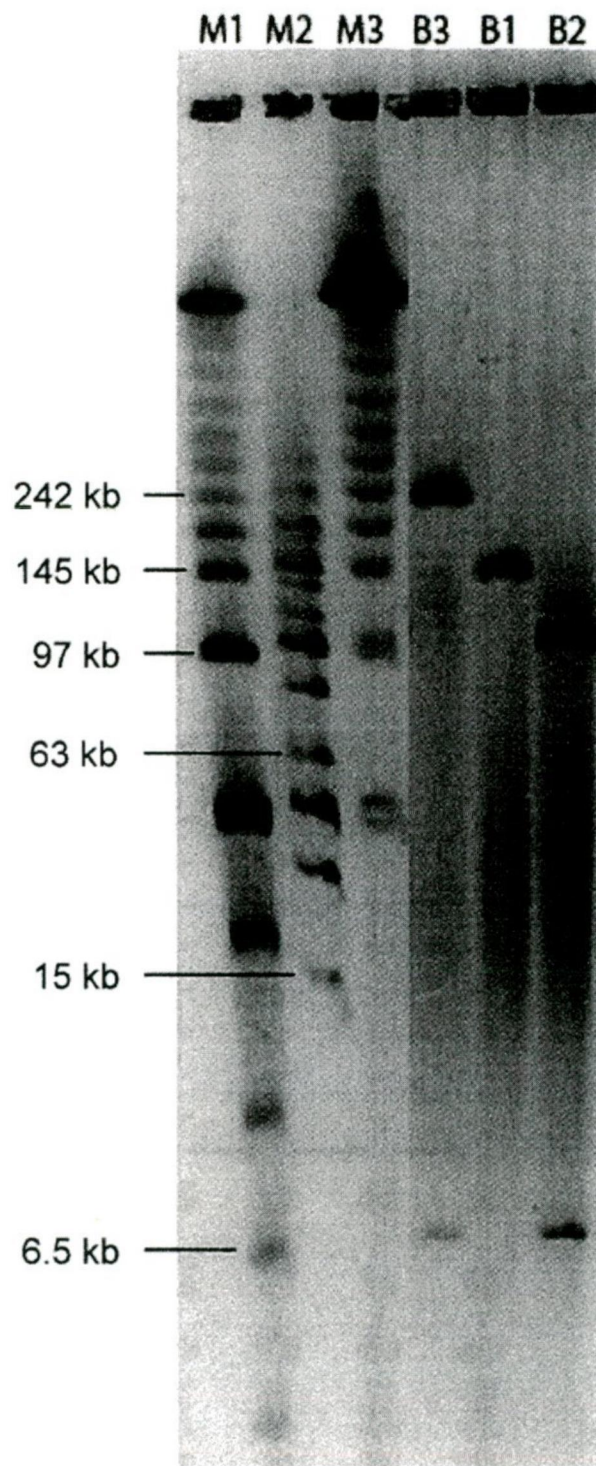


FIG. 4B

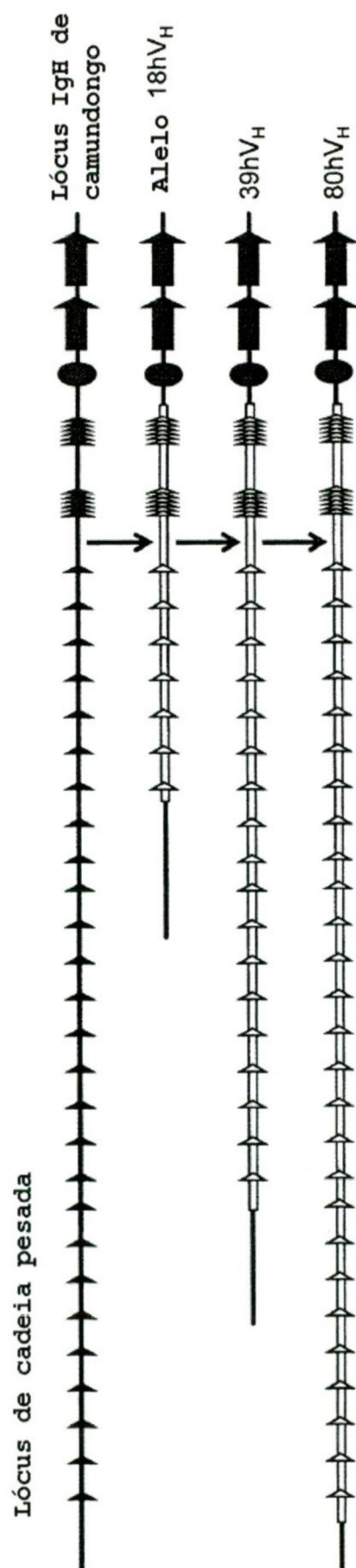


FIG 5A

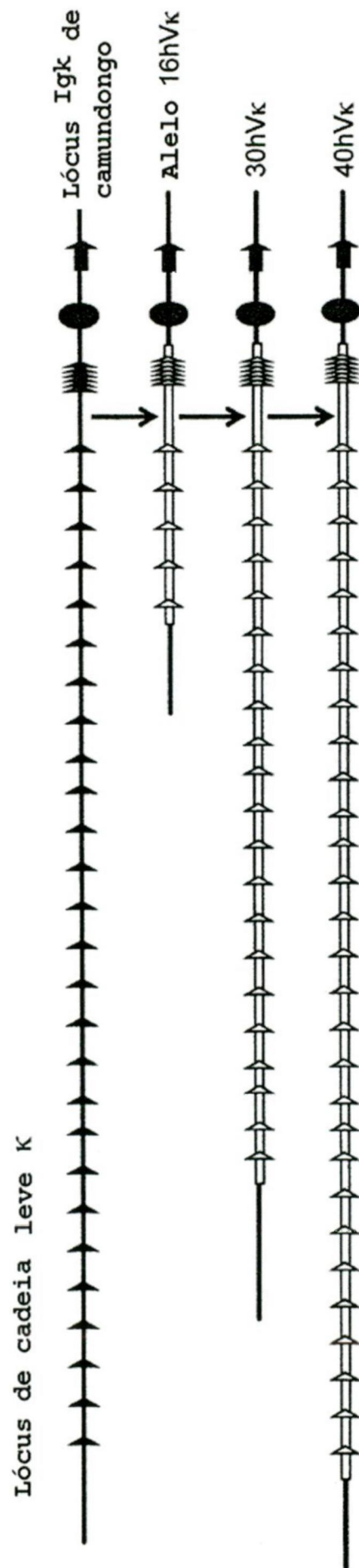


FIG. 5B

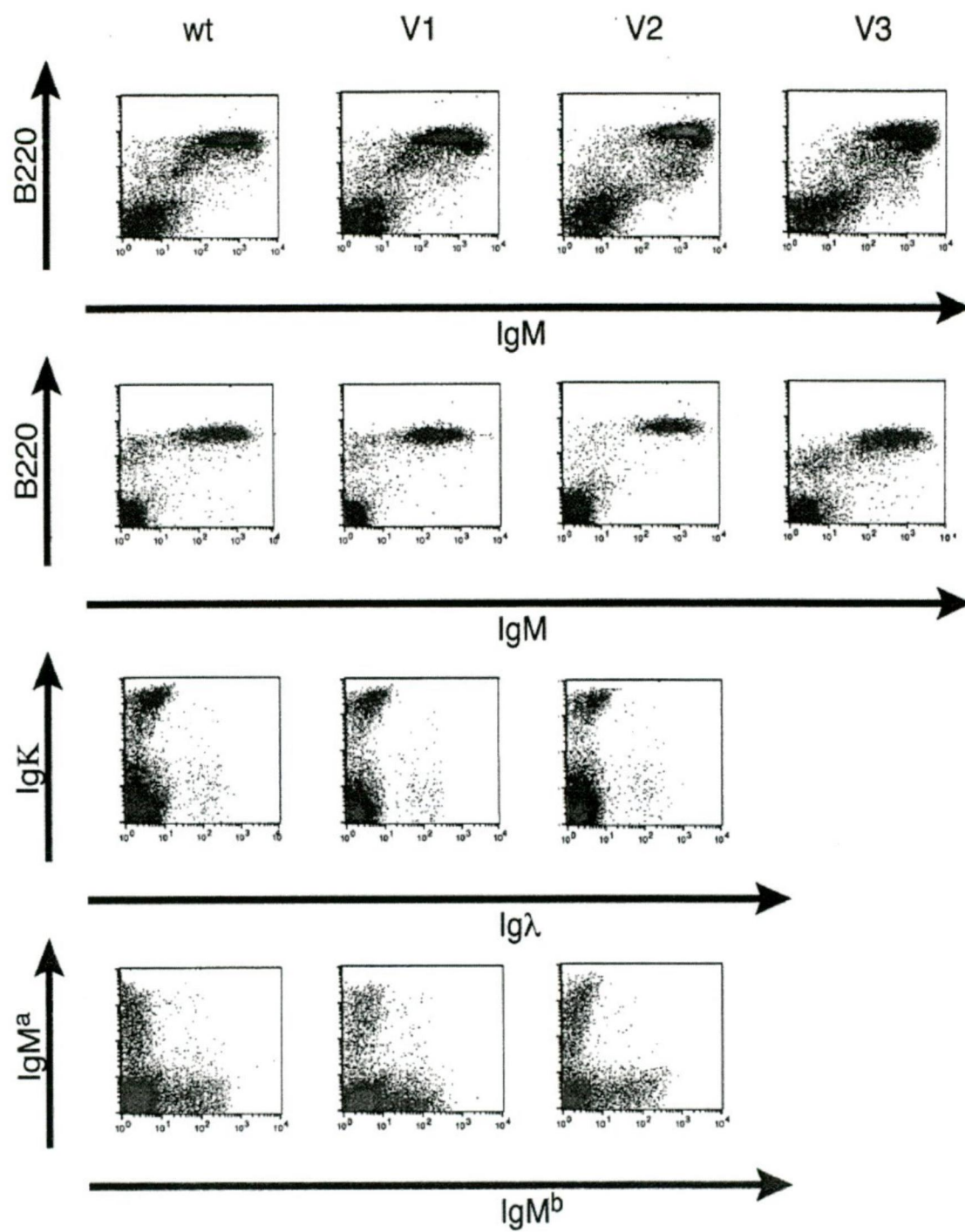


FIG. 6

3'V _H	N	D _H	N	5'J _H
(3-72) GCTAG	(D _H 1-26)	GGTATAGTGGGAGCTACTAC TAGTGGGgcCTAC	AGGC	CTTTTGATATC (3)
(3-9) GCAAAAG	CCCAGGGG	AGTGGGAGCTACTAC	ACCT	ATGCTTTTGATATC (3)
(3-7) GCGAGAGA	G	GGTATAGTGGGAaCTACT	GAGG	ACTTTGATtTAC (4)
(4-59) GCGAGAG	GGAC	AGTGGGAGC	CCT	CTTTGACTAC (4)
(3-23) GCGAAA	CC	TAGTGGGAGCTACT	C	CTGGTTCGACCCC (5)
(4-34) GCGAGAGG	(D _H 1-7)	GGTATAACTGGAaCTAC		
(1-2) GCGAGAG	AGGAG	GGTATAAaCTGGAaCT	CGA	ATGCTTTTGATATC (3)
(3-23) GCGAAAGA	GA	TATAAaCTGGA		ACTACTTTGACTAC (4)
(3-7) GCGAGAGA	G	GTATAAaCTGGAaCCaC	TGG	TACTTTGACTAC (4)
(4-59) GCGAG	GGGA	ATAAaCTGGAaC	CCC	CTTTGACTAC (4)
(4-39) GCGAGA	GG	TATAAaCTGGAaCT	TTTCTTTT	TTTGACTAC (4)
		TAACTGGAaCT	CTCTGGG	CTTTGACTAC (4)
(3-30) GCGA	(D _H 3-10)	GTATTACTATGGTTCGGGGAGTTATTATAAC		
(1-2) GCGAGAGA	AAAGGGC	TACTATGGTTCGGGGAG	CTC	TTGACTAC (4)
		TATTACTATGGTTCGGGGAGTTATTATAAC	GAAGGT	CTACGGTATGGACGTC (6)
(1-2) GCGAGAGA	(D _H 6-6)	GAGTATAGCAGCTCGTCC		
(3-48) GCGAGA	GA	GTATAGCAG		CTTTGACTAC (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) CAACAGAGTTAAGTACCCCTCC	GGA	GACG(1)
(1-9) CAACAGCTTAATAGTTACCCTC		GGACG(1)
(1-9) CAACAGCTTAATAGTTACC		ATTCAC(3)
(1-9) CAACAttTAATAGTTACCC		GCTCAC(4)
(3-15) CAGCAGTATAATAACTGGCCTC		TCAC(4)
(1-17) CTACAGCATAATAGTTACCC		GTGGACG(1)
(1-17) CTACAGCATAATAGTTACCCTC		GGACG(1)
(3-20) CAGCAGTATGGTAGCTCACCTC		GGACG(1)
(2-30) ATGCAAGGTACACACTGGCC		GTGGACG(1)
(2-30) ATGCAAGGtCACACTGGCC		GTACAC(2)
(2-30) ATGCAAGGTACACACTGGCC		GCTCAC(4)
(1-33) CAACAGTATGATAATCTCCCTCC		CACT(3)
(1-33) CAACAGTATGATAATCTCCC		ATTCAC(3)
(1-33) CAACAGTATGATAATCTCCC	CG	TCAC(4)
(1-33) CAACAGTATGATAATCTCCC		GATCAC(5)
(1-37) CAACGGAttTACAATGCC	GA	CACC(5)
(1-39) CAACAGAGTTACAGTACCC	CA	TGTACAC(2)
(1-39) CAACAGAGTTACAGTACCCCTC		TCAC(4)
(1-39) CAACAGAGTTACAGTACTCCTCC		CACT(4)

FIG. 7B

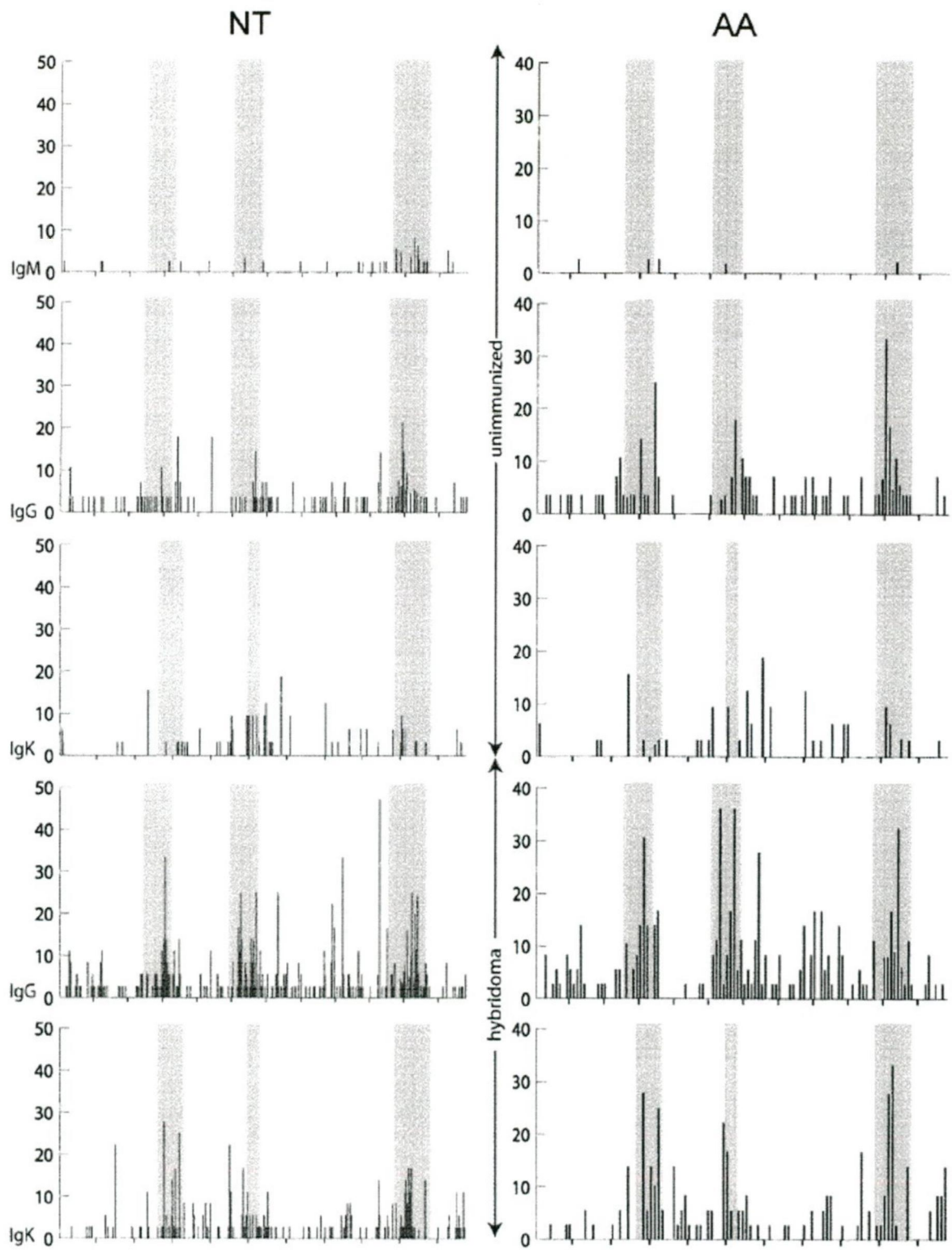


FIG. 8

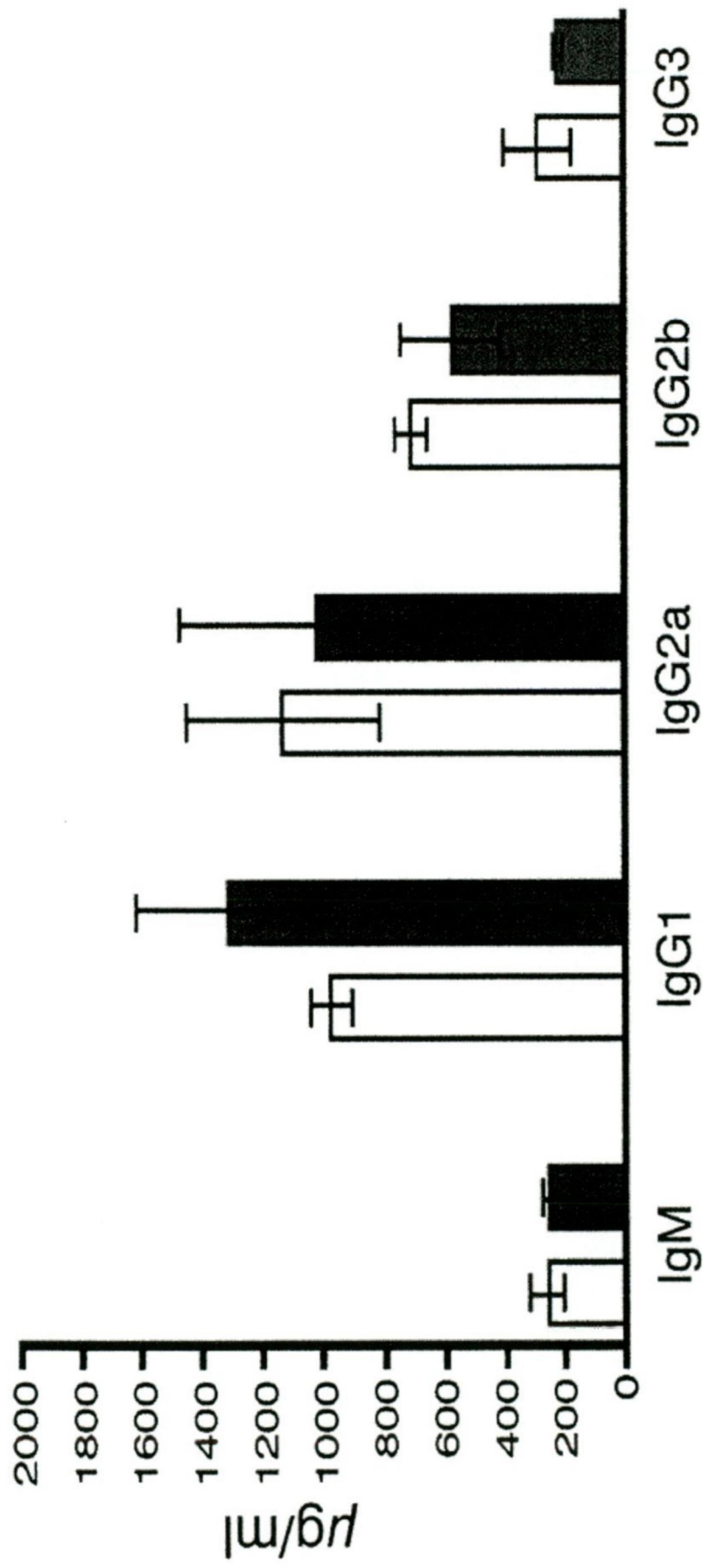


FIG. 9A

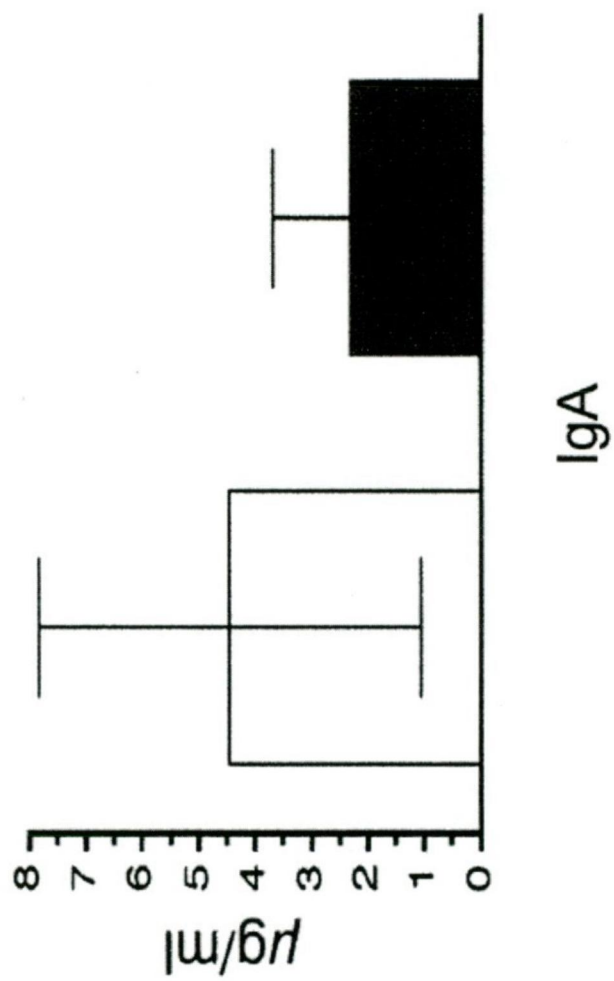


FIG. 9B

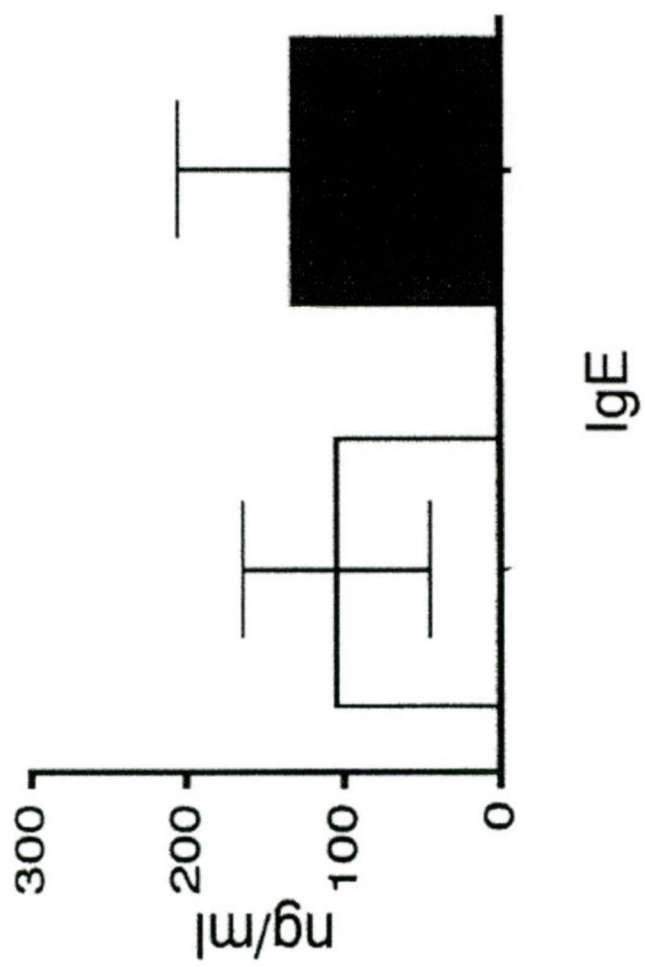


FIG. 9C

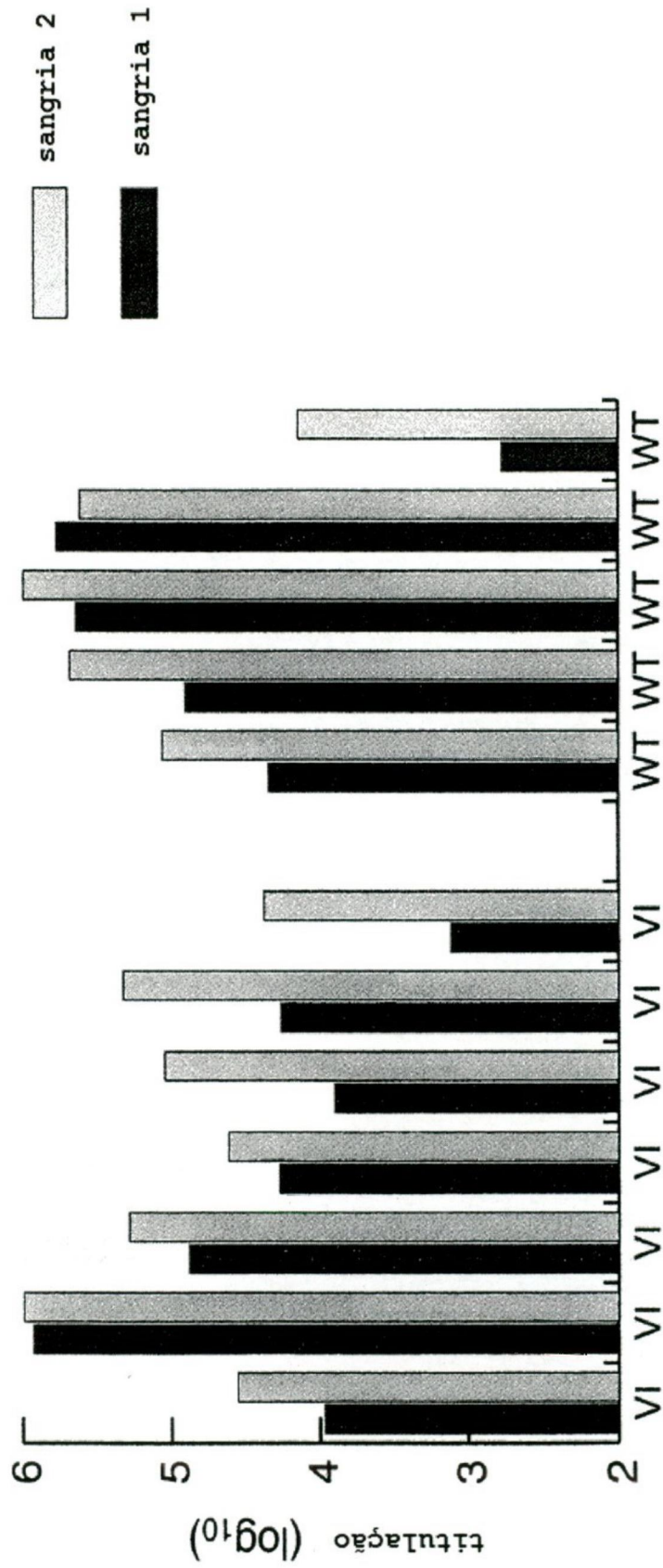


FIG. 10A

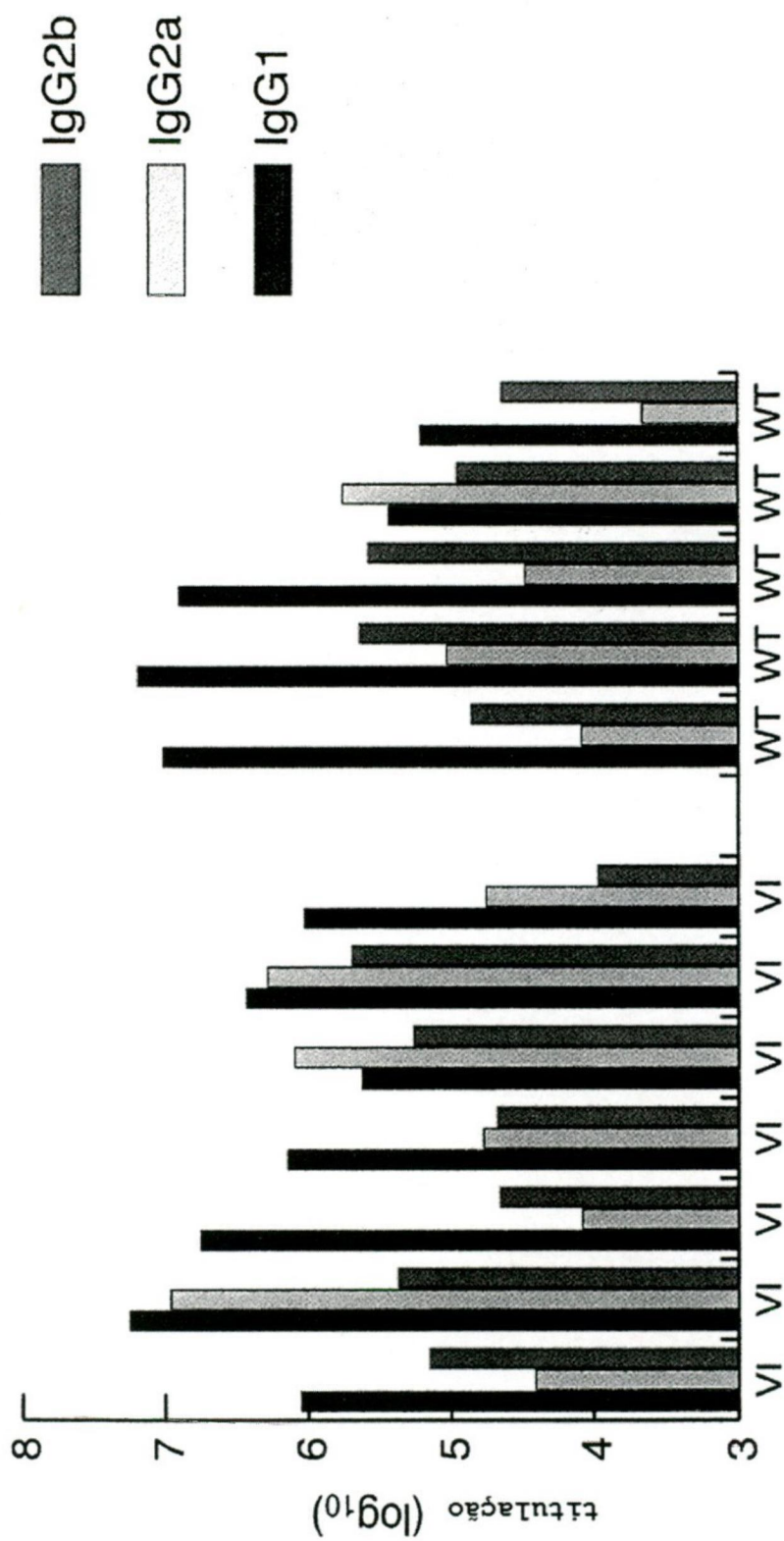


FIG. 10B

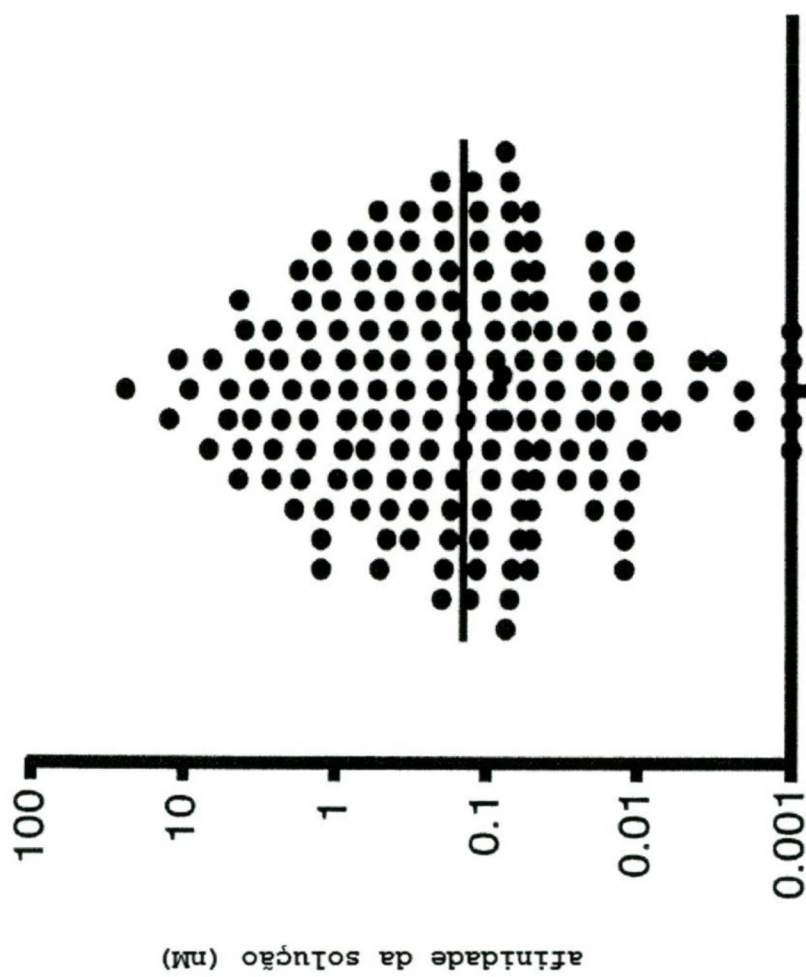


FIG. 11A

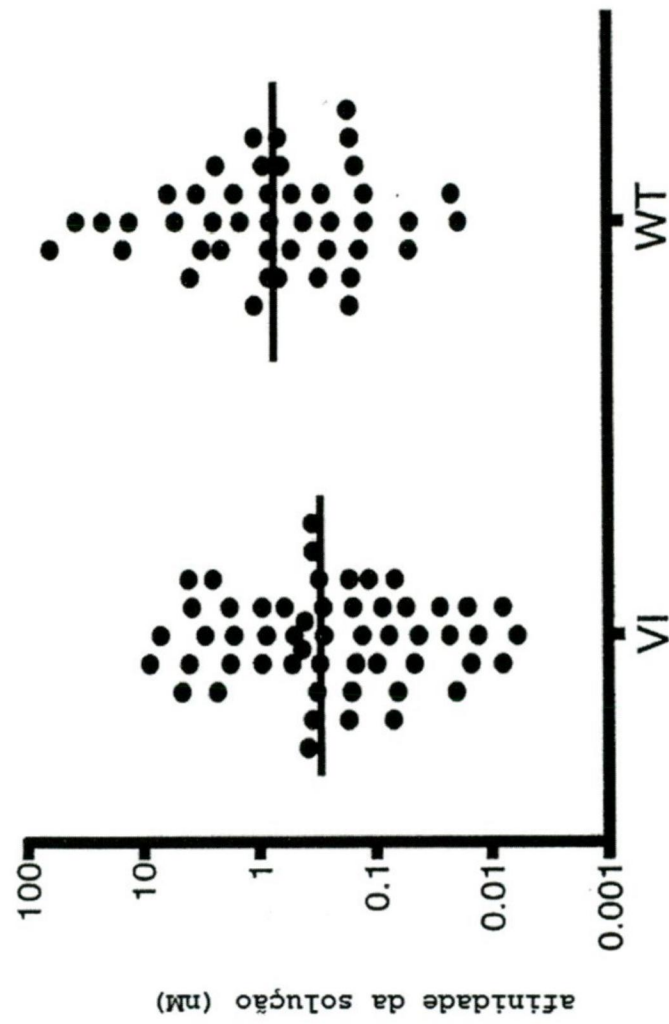


FIG. 11B

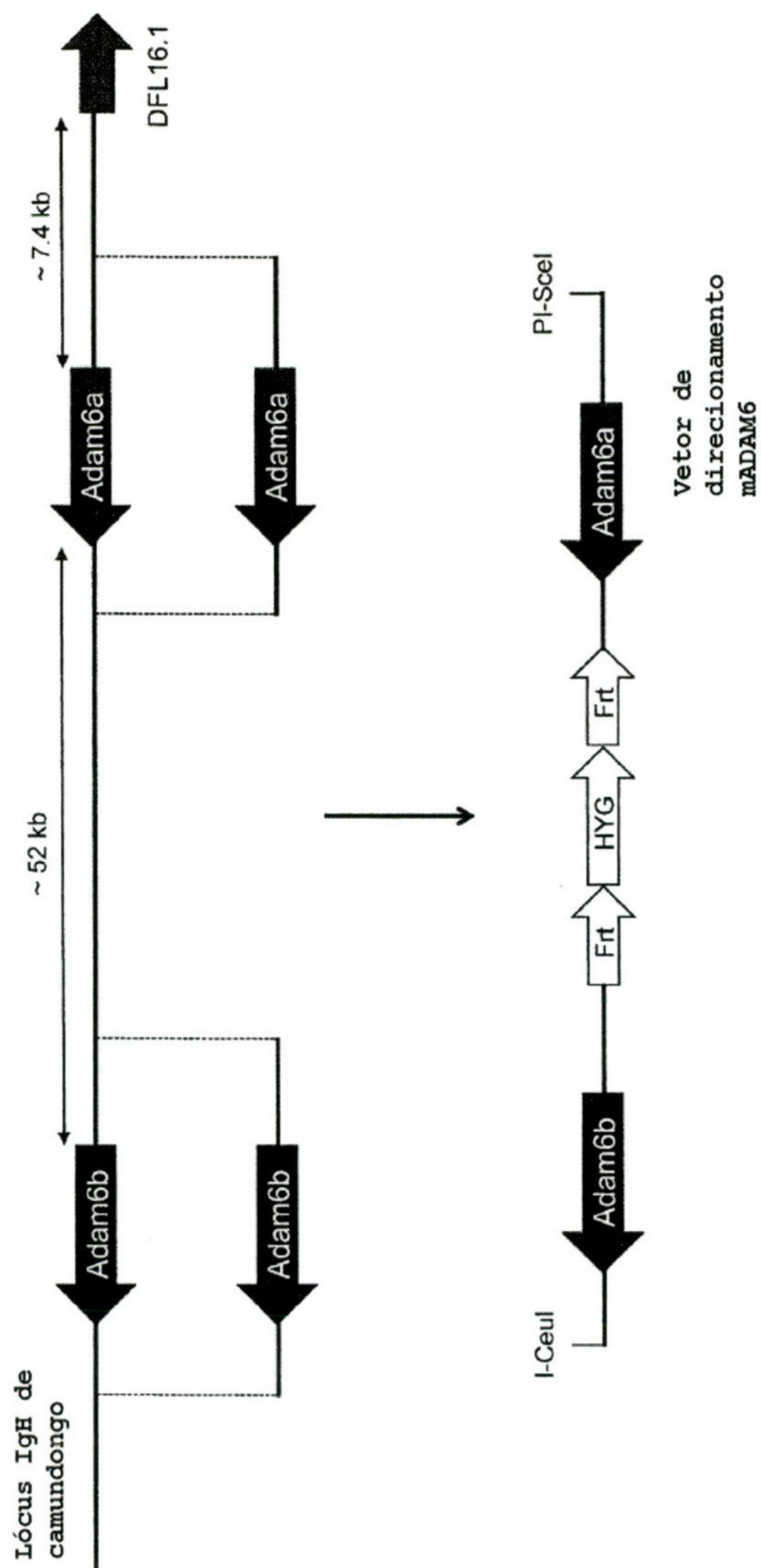


FIG. 12

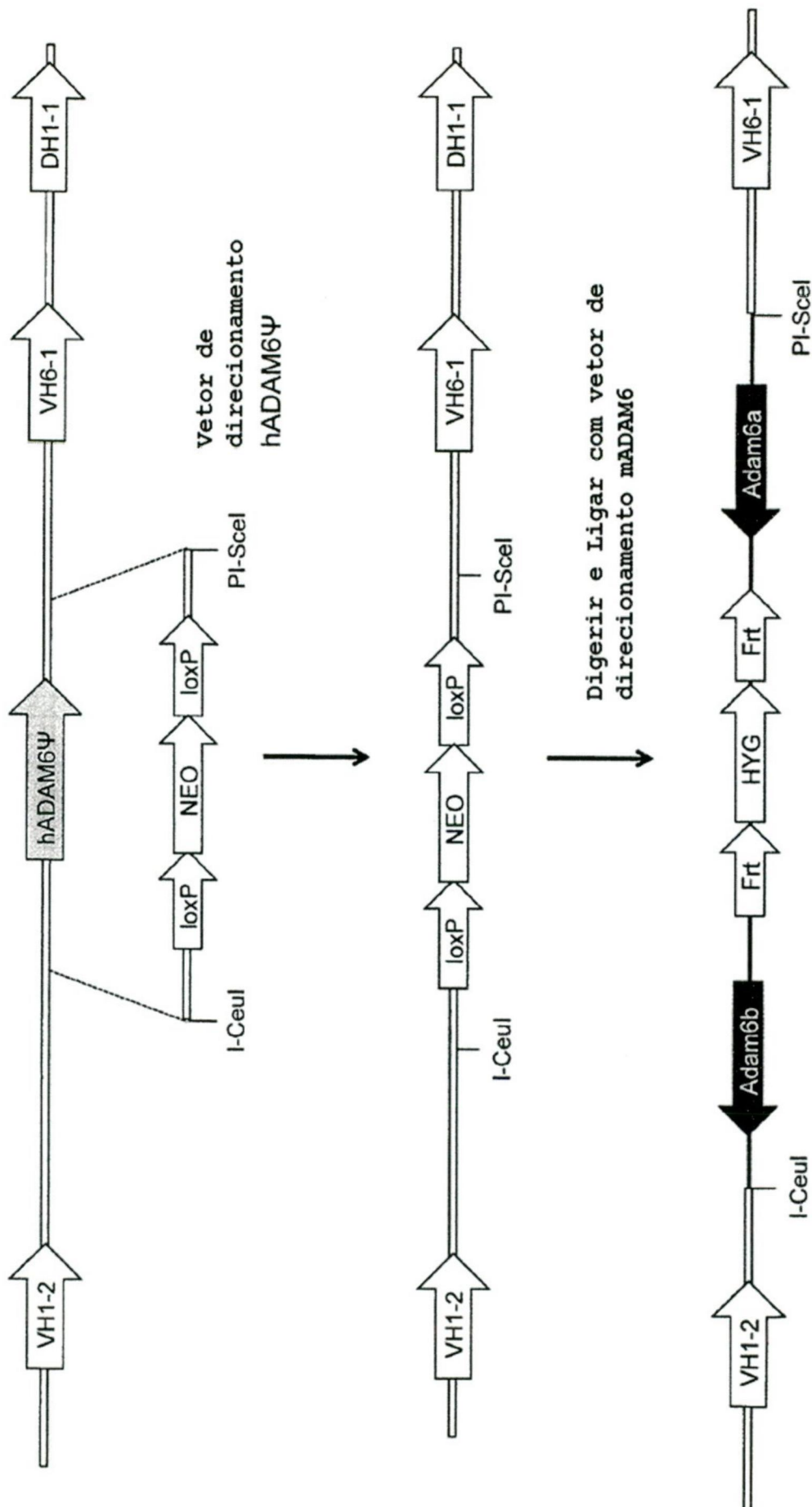


FIG. 13

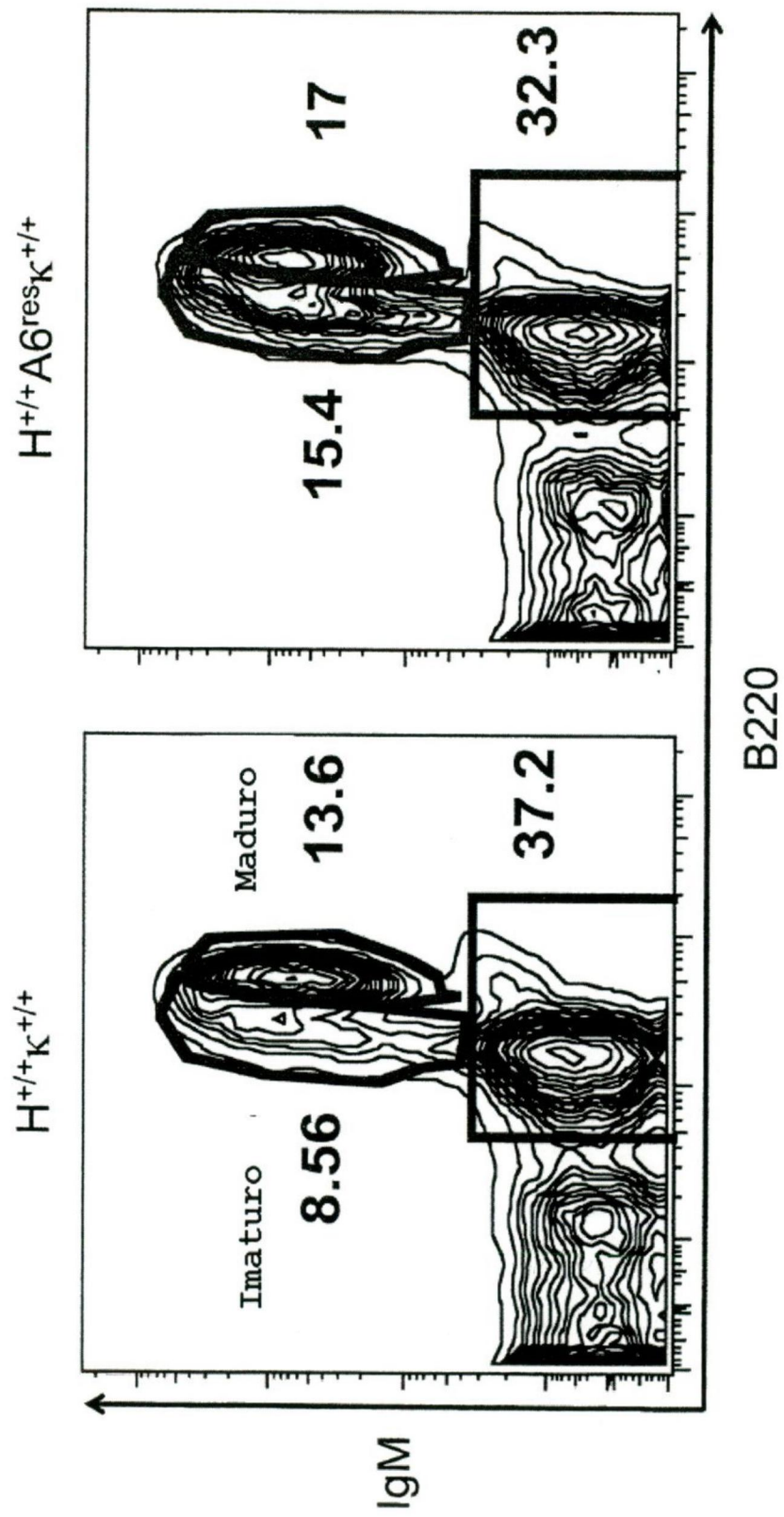


FIG. 14A

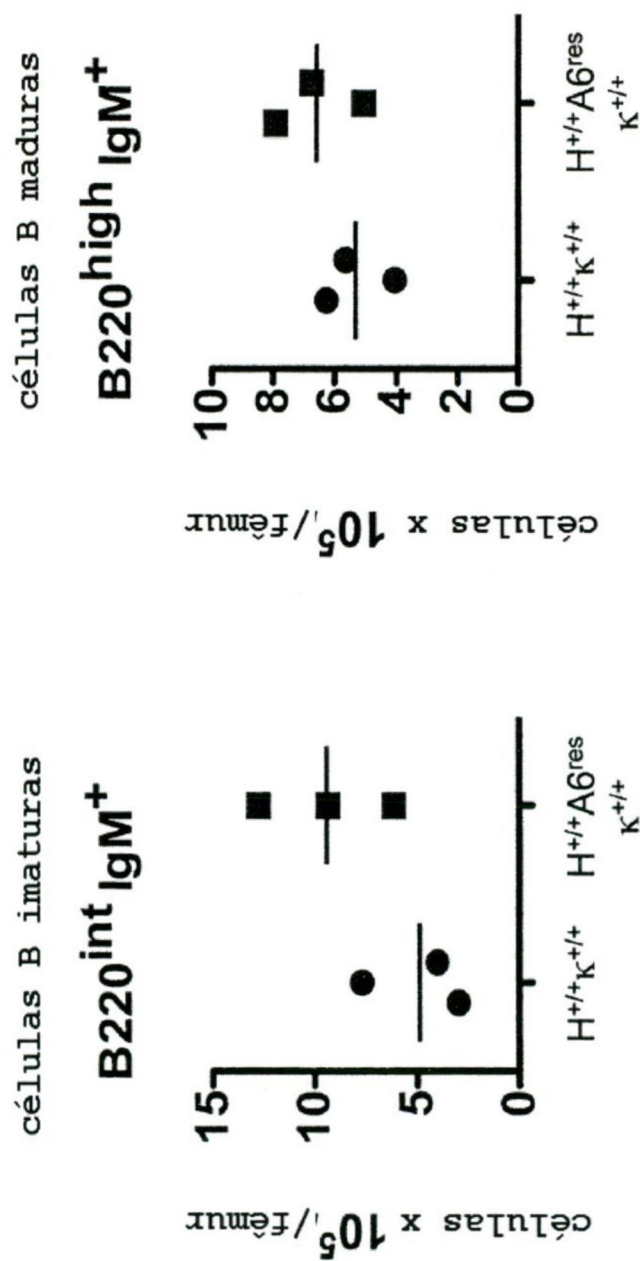


FIG. 14B

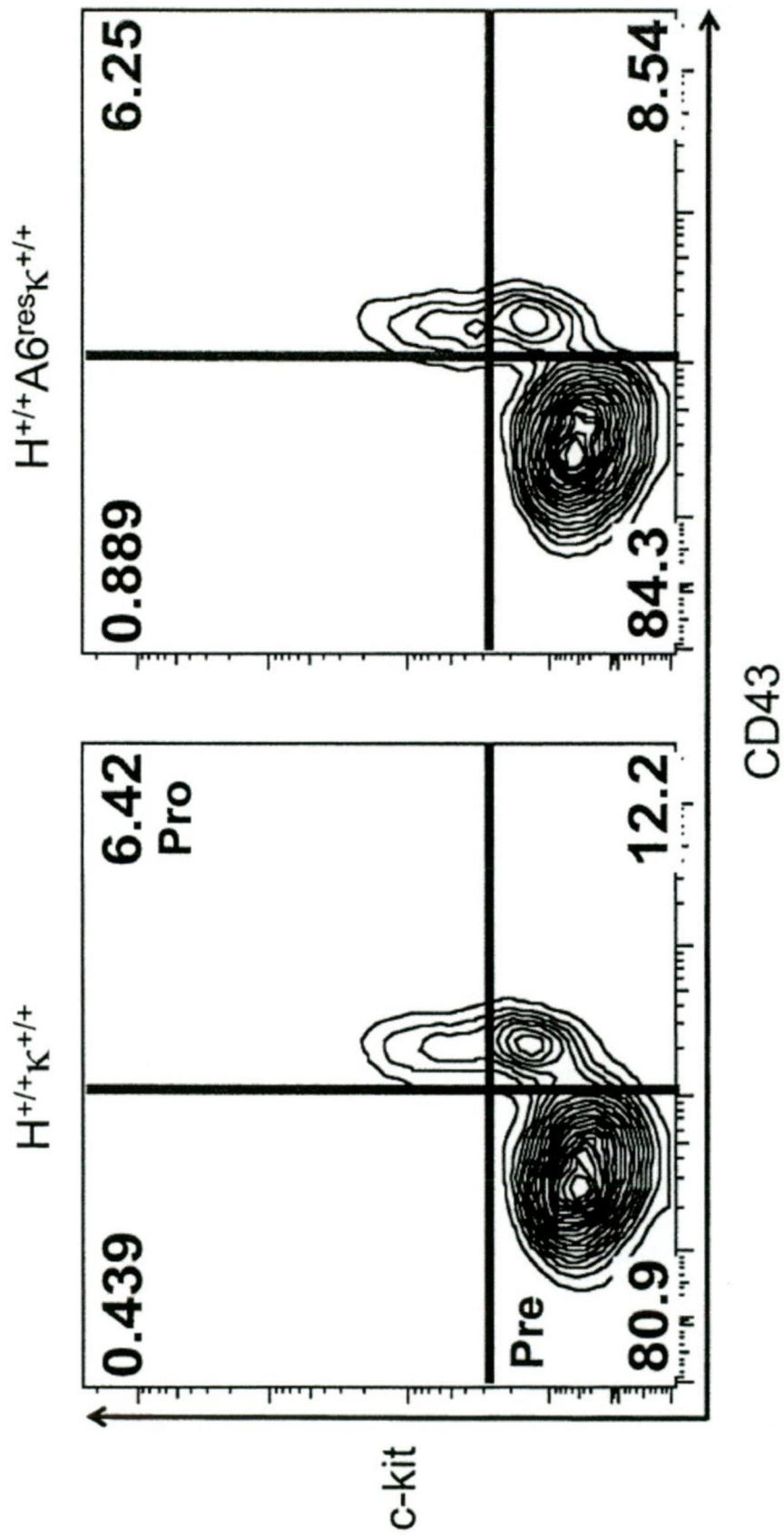


FIG. 15A

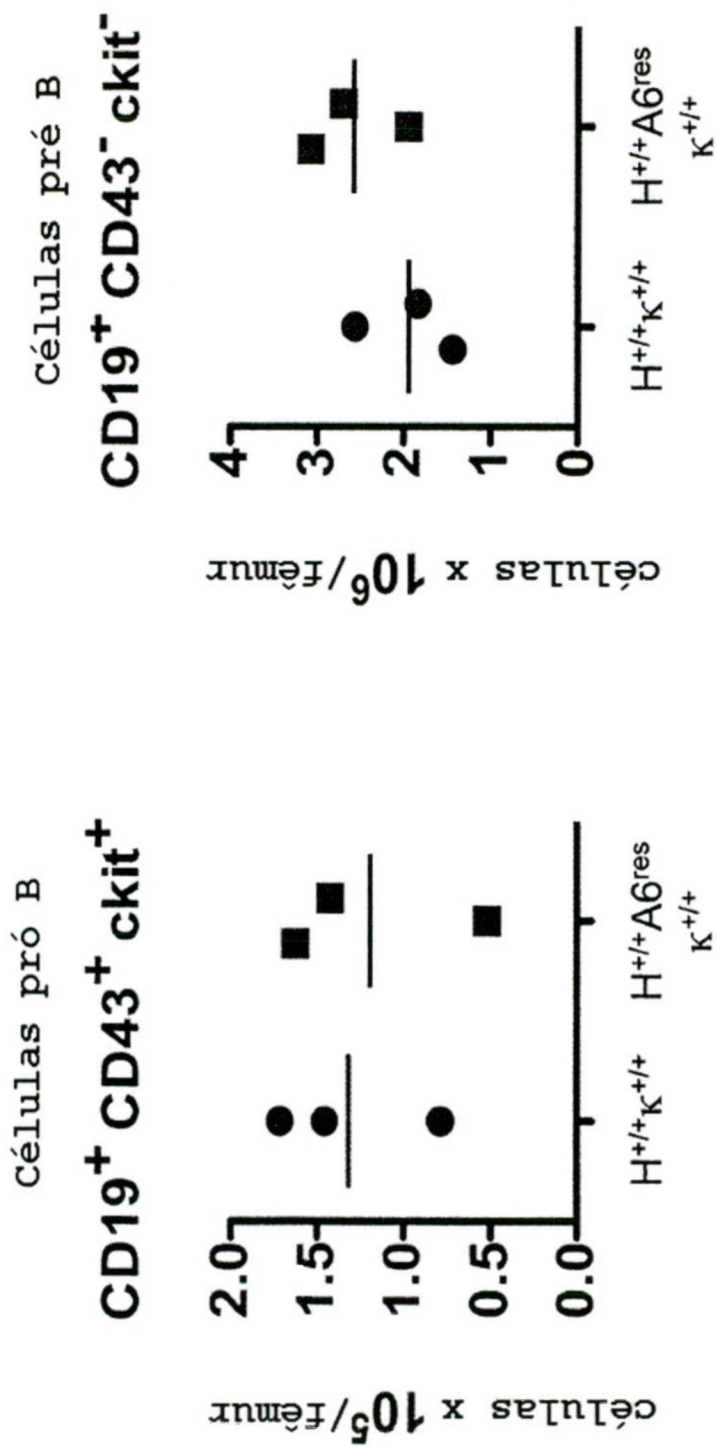


FIG. 15B

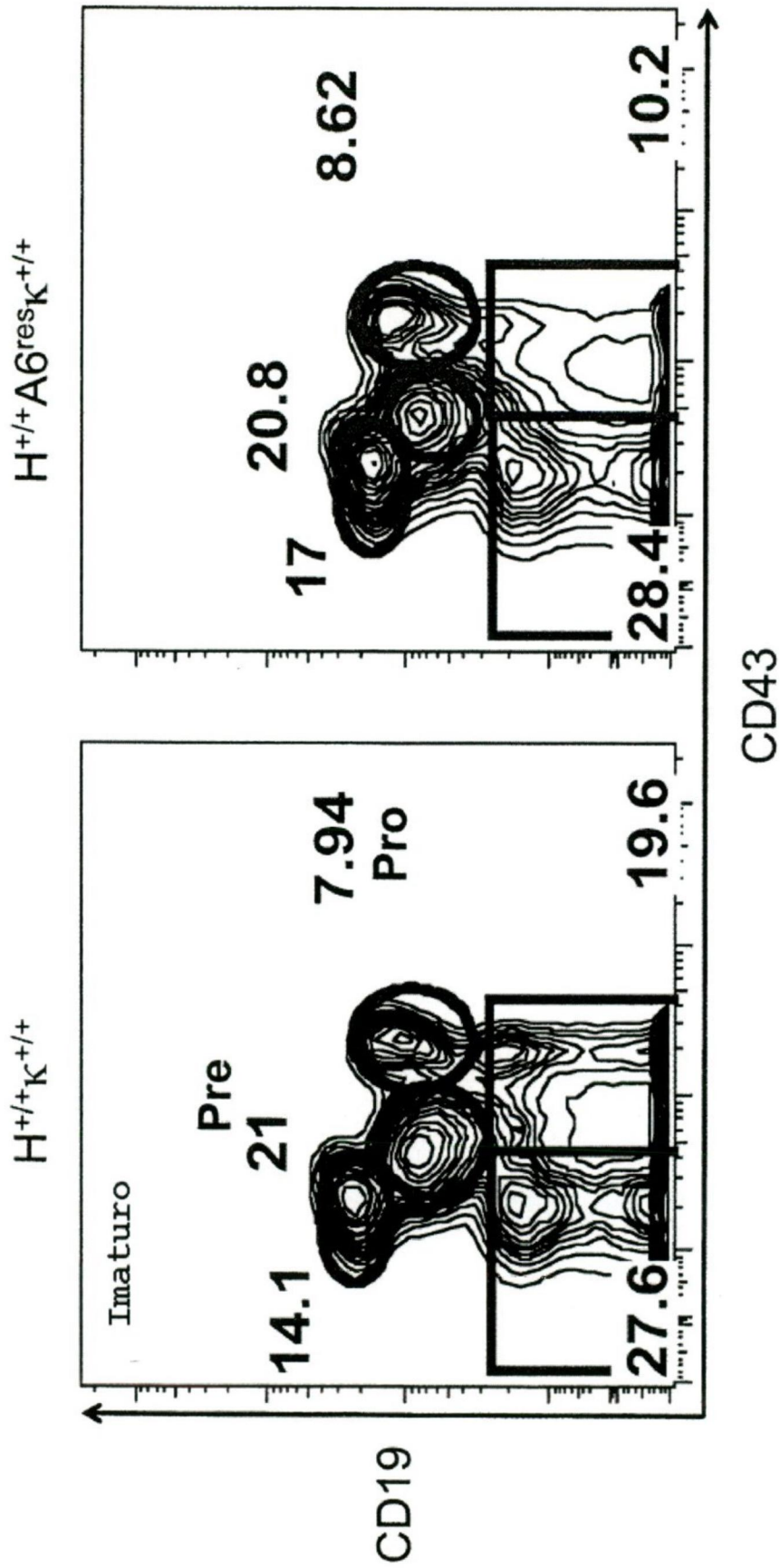


FIG. 16A

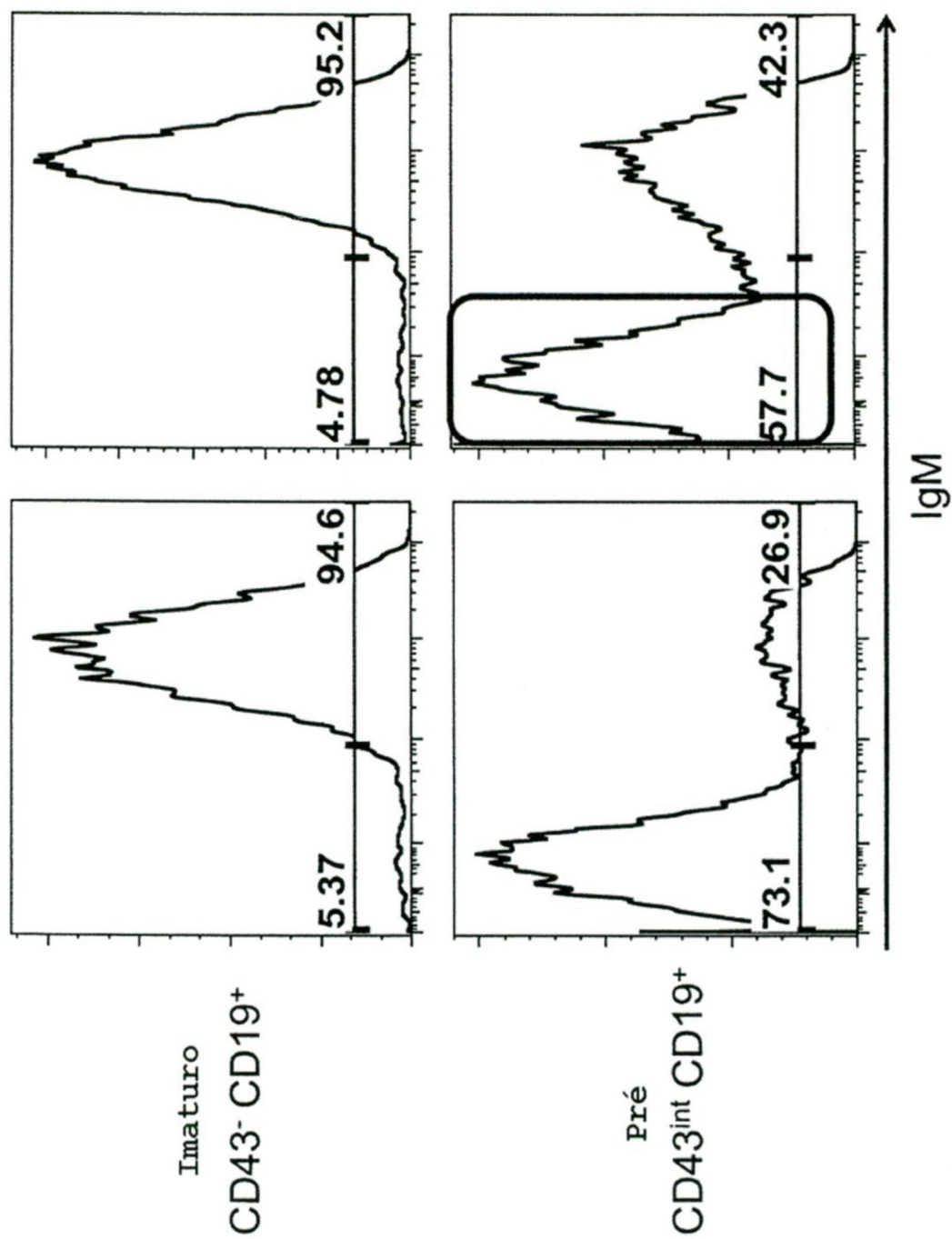


FIG. 16B

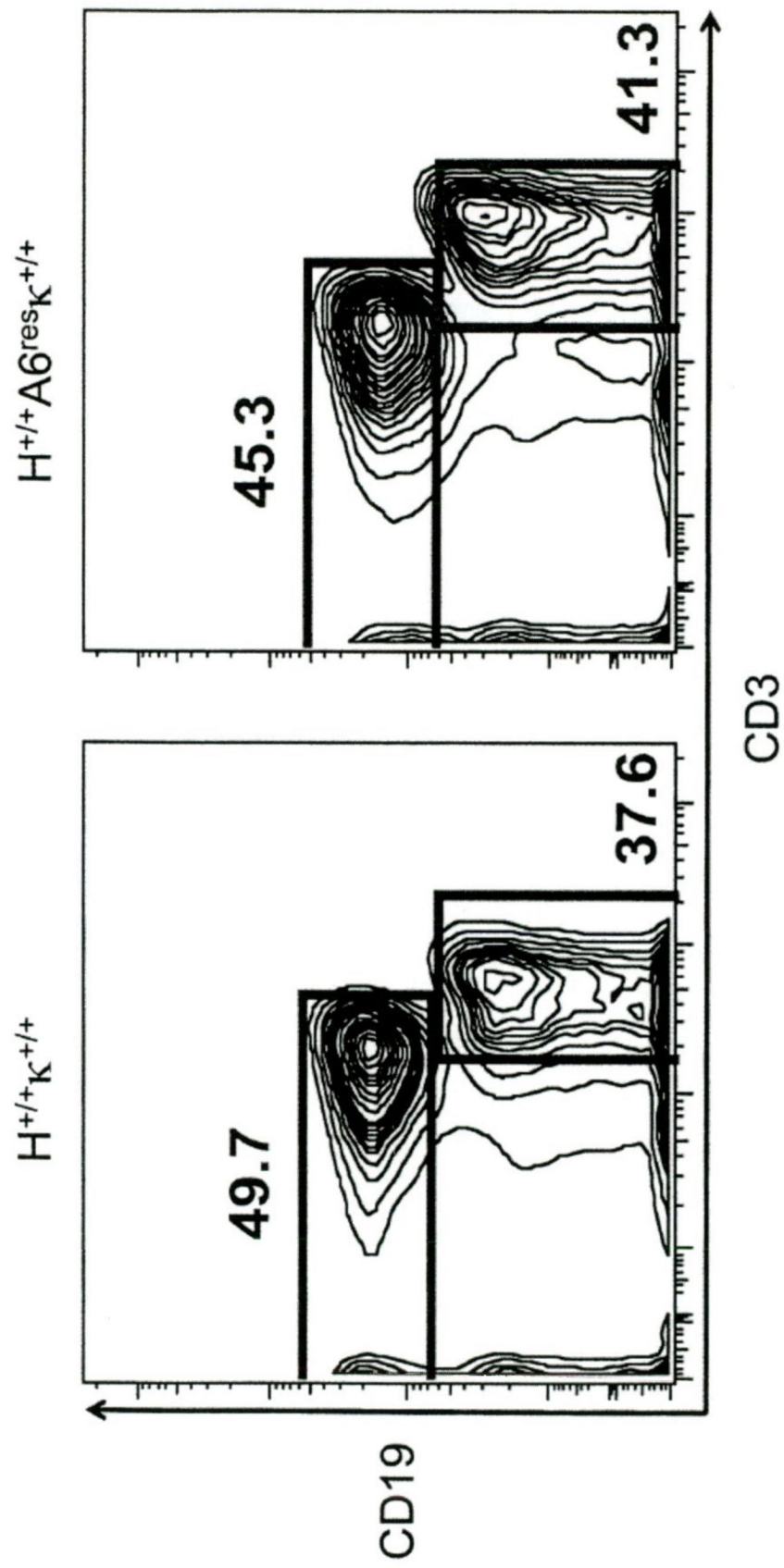


FIG. 17A

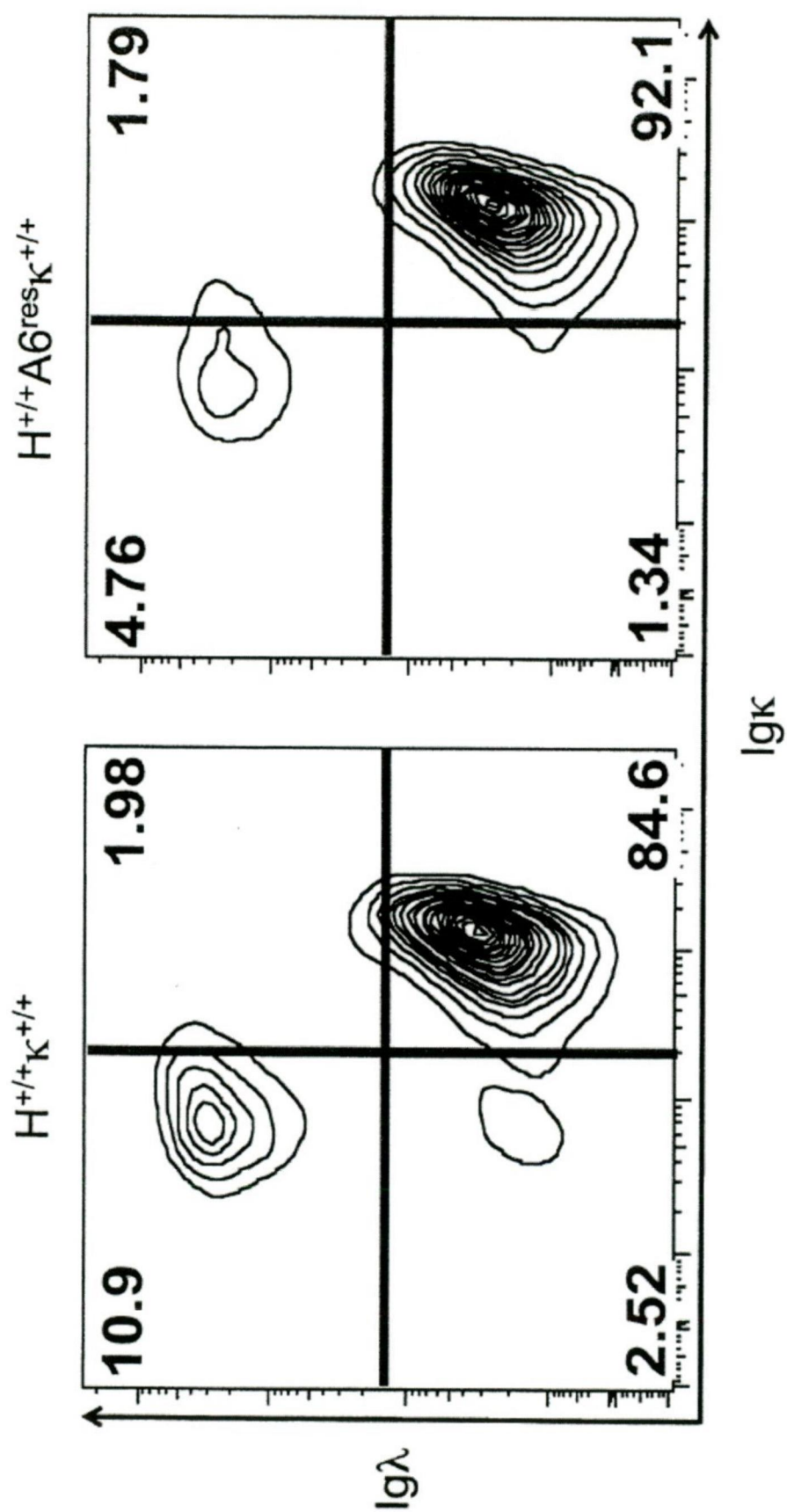


FIG. 17B

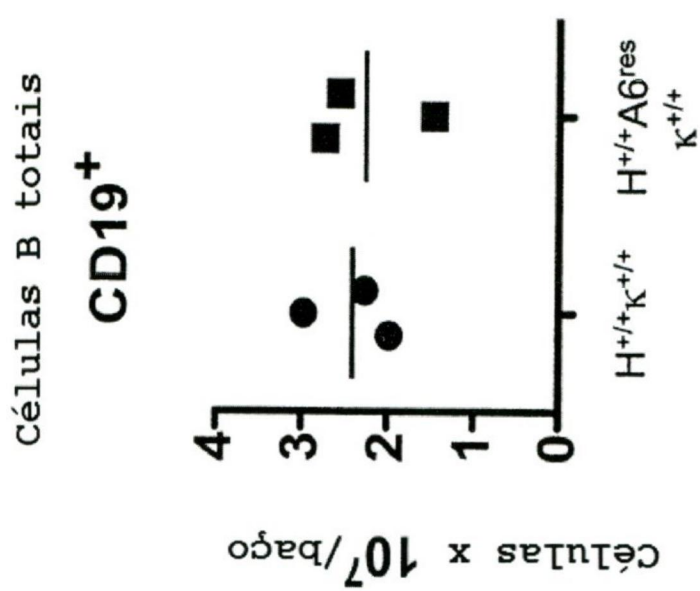


FIG. 17C

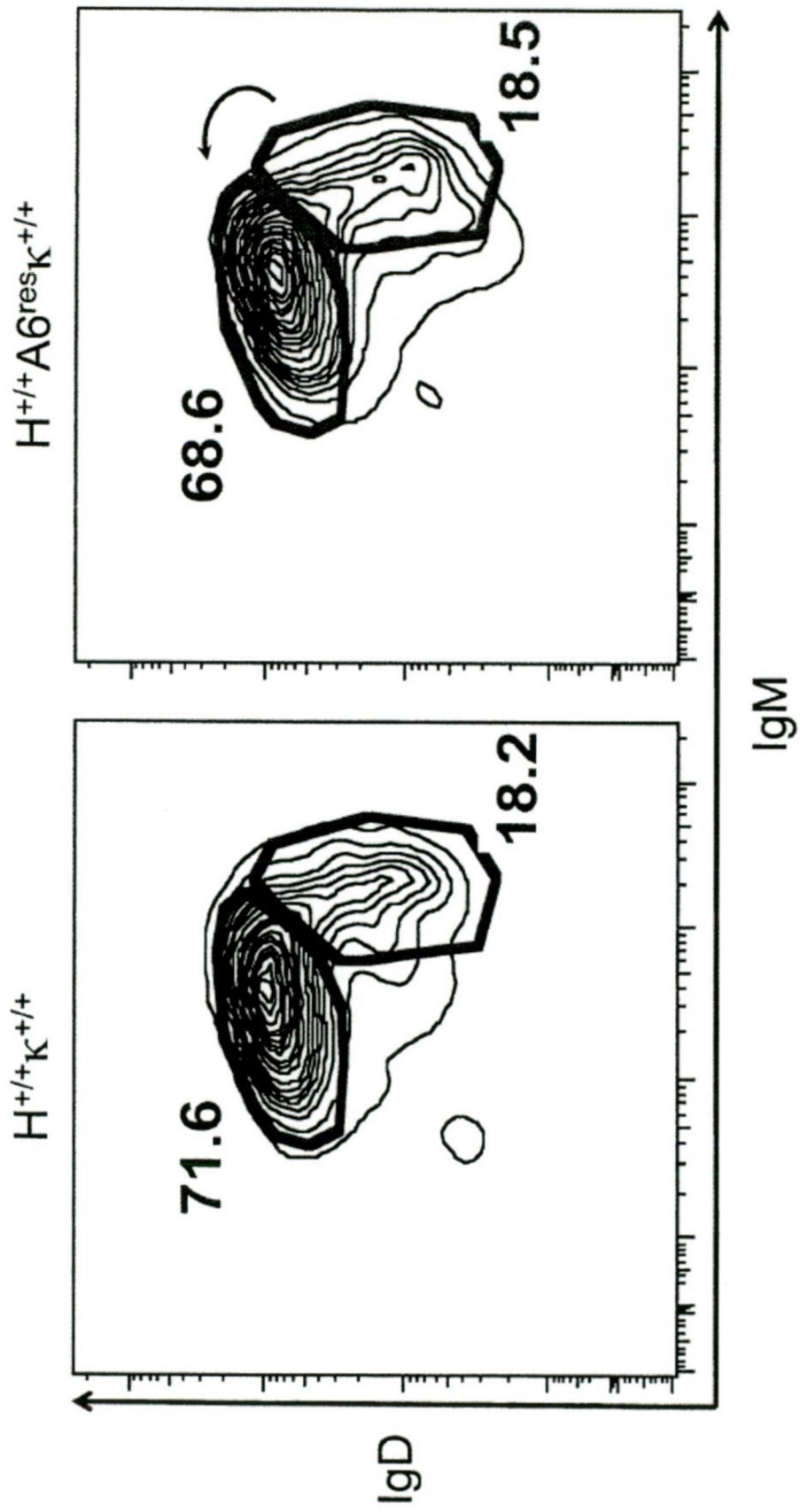


FIG. 18A

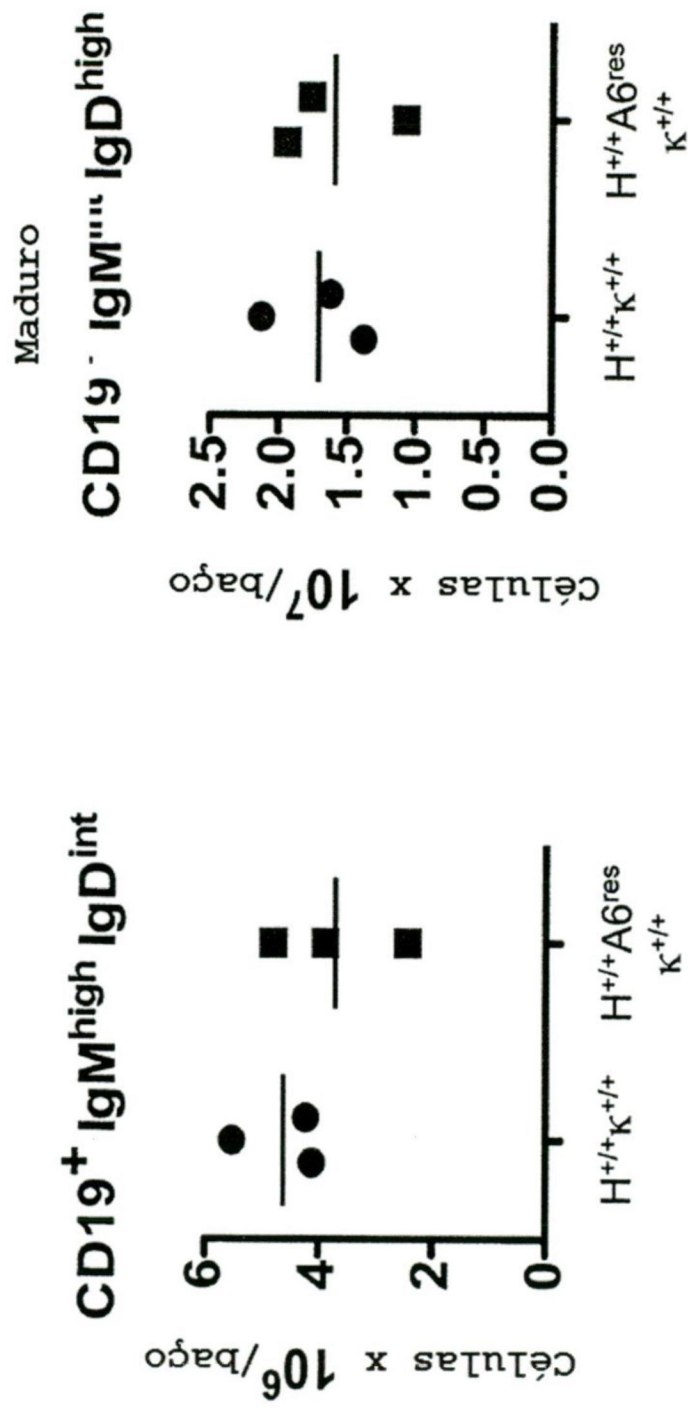


FIG. 18B

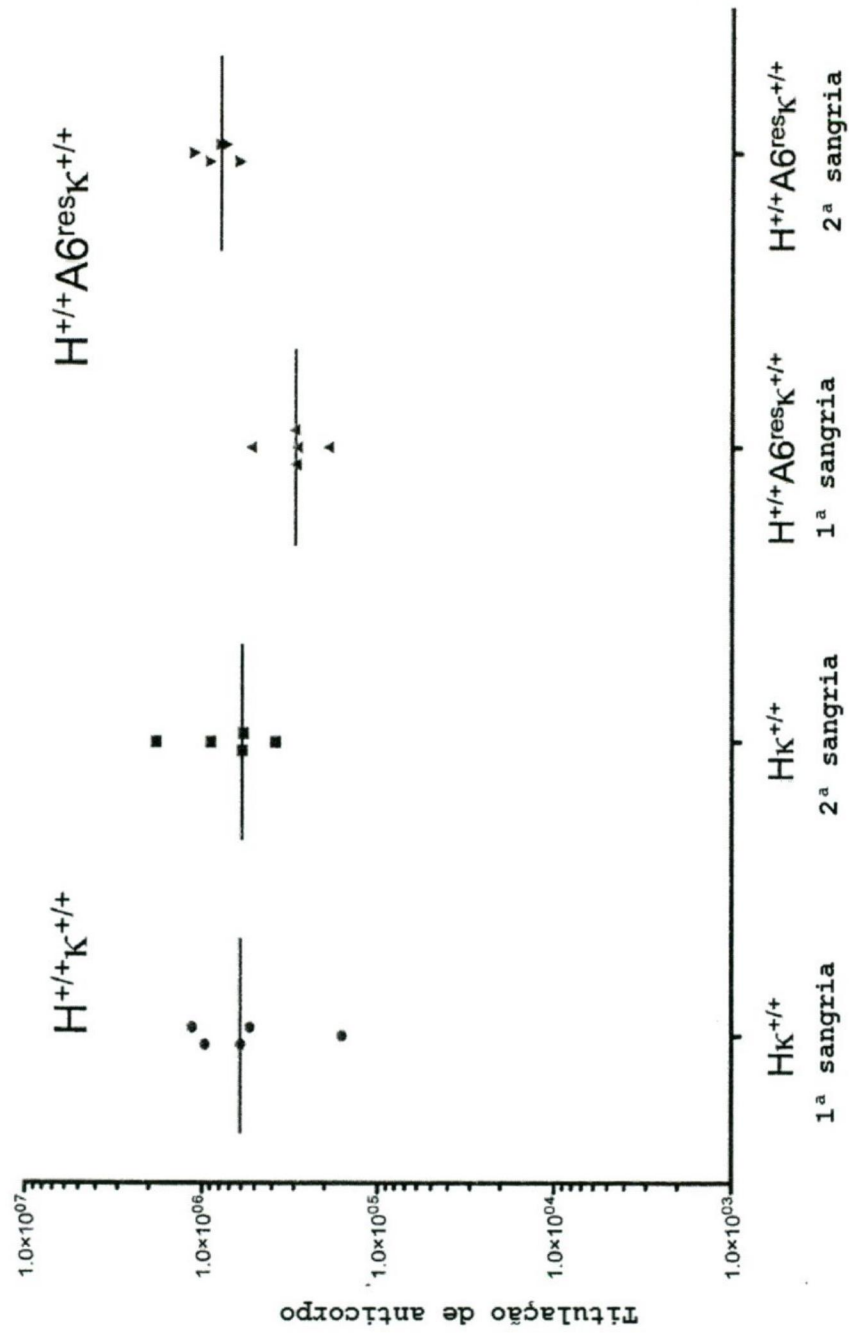


FIG. 19

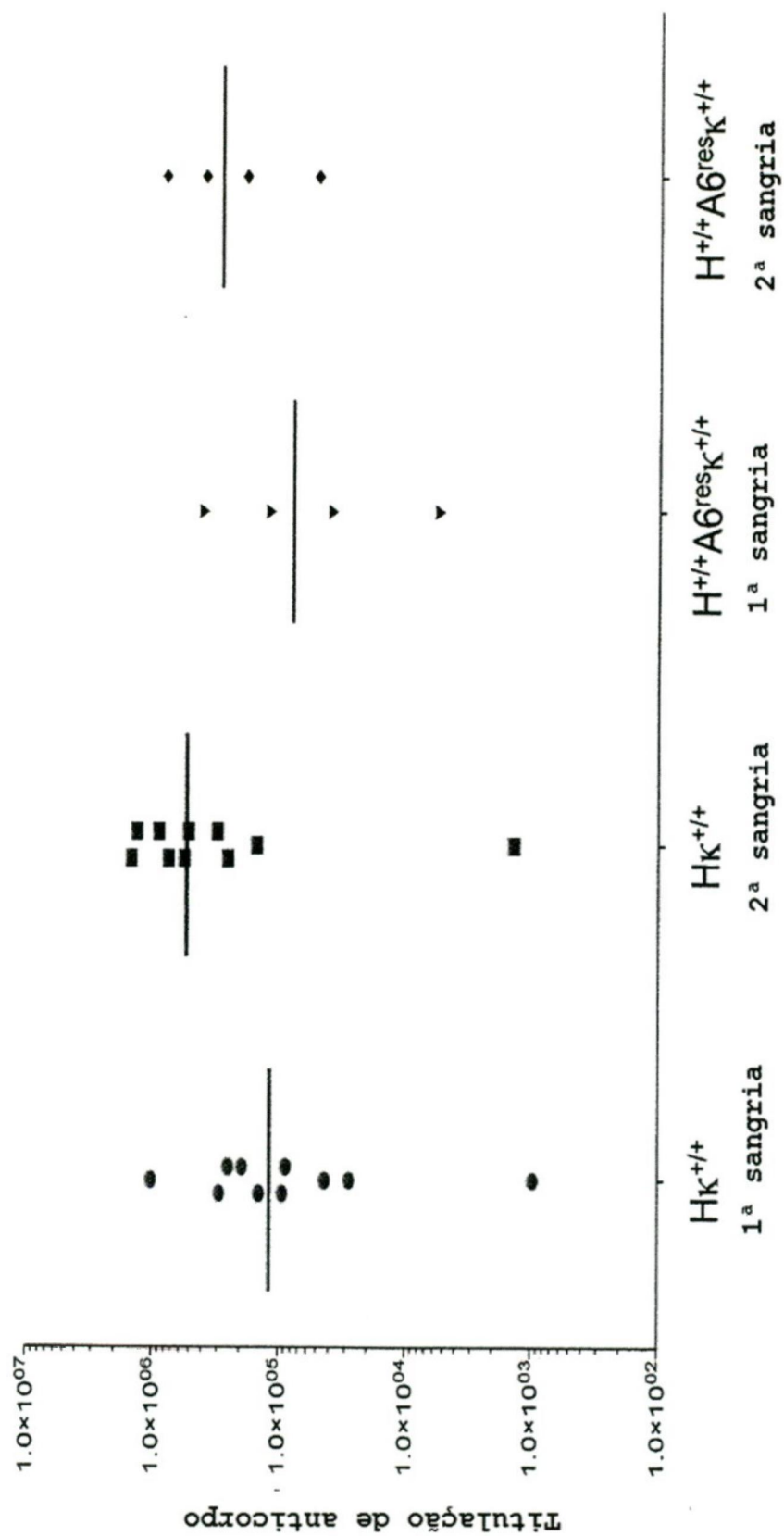
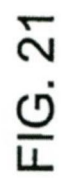


FIG. 20



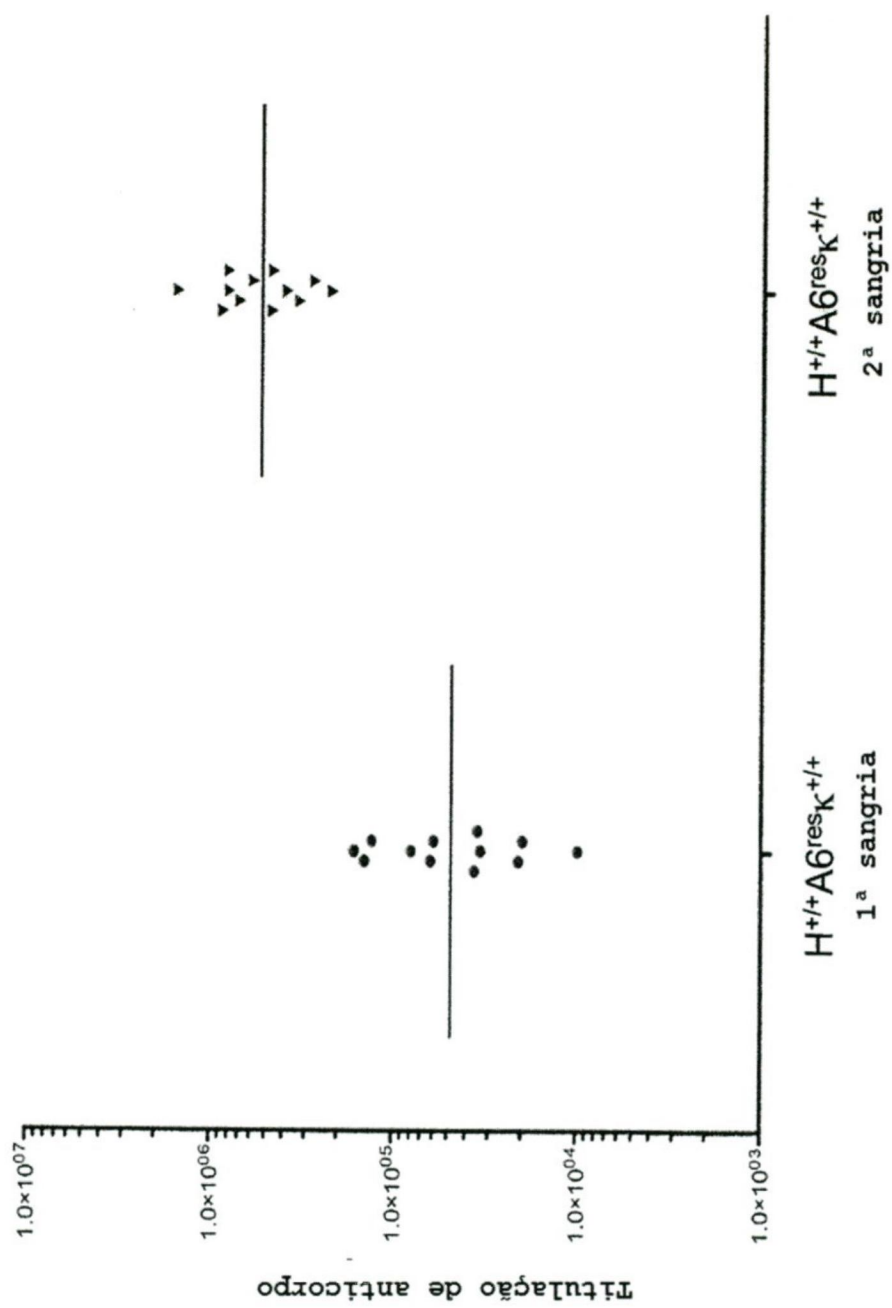


FIG. 22