



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 297 828**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **93919151 .6**

86 Fecha de presentación : **24.08.1993**

87 Número de publicación de la solicitud: **0658197**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.06.1995**

54 Título: **Sustitución selectiva de un gen sin secuencias residuales endógenas y seleccionables.**

30 Prioridad: **25.08.1992 DE 4228162**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

73 Titular/es: **Miltenyi Biotec GmbH**
Friedrich-Ebert-Strasse 68
51429 Bergisch Galdbach, DE

72 Inventor/es: **Rajewsky, Klaus y**
Zou, Yong-Rui

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

DESCRIPCIÓN

Sustitución selectiva de un gen sin secuencias residuales endógenas y seleccionables.

5 La invención se refiere a un procedimiento para la generación de un ratón transgénico homocigoto que comprende la sustitución de un gen de anticuerpo o de un segmento génico de anticuerpo en la vía germinativa del ratón por un gen de anticuerpo homólogo o un segmento génico de anticuerpo homólogo de un ser humano.

10 La invención se refiere asimismo al ratón transgénico homocigoto que se puede obtener mediante este procedimiento, así como a su uso para la expresión de productos génicos.

15 La recombinación homóloga entre secuencias de ADN presentes en un cromosoma y nuevas secuencias de ADN clonadas añadidas (denominada en los sucesivos “gene targeting”) permite insertar un gen clonado en el genoma de una célula viva. Usando células germinativas embrionarias se pueden obtener con este procedimiento a través de animales quiméricos que son homocigotos para la mutación deseada (M.R. Capecchi, Science 244, 1288 (1989)). En R.D. Camerini-Otero, R. Kucherlapati, The New Biologist, 2 (4), 334-341 (1990) se describe el uso de la “gene targeting” para la inactivación de un gen (interrupción génica) y la “corrección génica”, es decir, la adición de un segmento génico no presente previamente.

20 En relación con la “corrección génica” también son de mencionar los procedimientos de inserción descritos en los documentos WO 90/11354 y WO 91/19796, en los que se inserta por recombinación homóloga un segmento génico deseado en el genoma de una célula. En el documento mencionado en último lugar se elimina, en un segundo paso, el gen endógeno todavía funcional, de manera que se sustituye un segmento génico endógeno por un segmento génico homólogo. El documento WO 91/19796 da a conocer además un procedimiento de, virtualmente, una sola etapa, es
25 decir, una cotransfección, en el que el marcador de resistencia no se encuentra en el segmento génico que se ha de insertar sino que se introduce por separado. Sin embargo, en los ejemplos de procedimiento mencionados en este documento únicamente se insertan segmentos génicos homólogos que varían tan sólo ligeramente (como máximo 2x2 variaciones de bases), de modo que cabe preguntarse hasta qué punto todavía se puede detectar un acontecimiento de recombinación seleccionable cuando disminuye la homología (con la reducida frecuencia de recombinación del
30 procedimiento de dos etapas).

En este documento tampoco se muestra que la mutación realizada en las células madre embrionarias se transmita a la vía germinativa.

35 K. Rajewsky (Science, 256, 483 (1992)) sugiere el uso de la recombinación homóloga para la sustitución génica para, por ejemplo, identificar la función de un gen recién descubierto.

40 En este sentido, el objetivo de la presente invención consistía en proporcionar un procedimiento directo exitoso en un solo paso para la generación por recombinación homóloga de ratones manipulados genéticamente que contuvieron segmentos génicos de anticuerpo homólogos del hombre.

El solicitante ha descubierto un procedimiento que permite sustituir selectivamente y en un solo paso segmentos génicos de anticuerpo individuales en la vía germinativa de un ratón por segmentos génicos del hombre.

45 La presente invención se refiere, por lo tanto, a un procedimiento para la generación de un ratón transgénico homocigoto por recombinación homóloga, que comprende la sustitución de un gen de anticuerpo o de un segmento génico de anticuerpo en la vía germinativa del ratón por un gen de anticuerpo homólogo o un segmento génico de anticuerpo homólogo de un ser humano, en el que

- 50 - se transfecta la línea celular madre embrionaria del ratón con un vehículo de recombinación marcado de forma seleccionable, siendo el vehículo de recombinación un vector de reemplazo y comprendiendo éste el segmento génico homólogo que se ha de insertar o el gen homólogo que se ha de insertar, secuencias homólogas a las secuencias que flanquean el segmento de ADN endógeno que se ha de sustituir y un gen marcador, y sustituyéndose en el acontecimiento de recombinación funcionalmente el gen endógeno o el
55 segmento génico endógeno en un solo paso por el gen homólogo o el segmento génico homólogo con la ayuda del vehículo de recombinación marcado de forma seleccionable;
- se seleccionan los clones celulares transfectados de forma estable que presentan el gen marcador; y
- 60 - éstos se seleccionan selectivamente por PCR y/o transferencia de Southern.

65 De acuerdo con la presente invención, el vehículo de recombinación marcado de forma seleccionable es un vector de reemplazo y lleva el segmento génico que se ha de insertar o el gen que se ha de insertar, secuencias homólogas a las secuencias que flanquean el segmento de ADN endógeno que se ha de sustituir y un gen marcador, en especial neomicina o higromicina, preferentemente neomicina. El vehículo de recombinación puede contener además secuencias de reconocimiento virales (por ejemplo SV40), secuencias adicionales para intensificar la expresión génica, secuencias diana para sistemas de recombinación pro- y eucariotas. Las secuencias mencionadas en último lugar, especialmente la secuencia de reconocimiento LoxP para Cre o la secuencia de reconocimiento Frt para Flp, se pueden usar para

eliminar selectivamente los genes marcadores así como segmentos del gen diana no funcionales que, dado el caso, aún quedan. De este modo es posible sustituir en el primer paso el segmento génico endógeno por un segmento génico homólogo de otro mamífero y eliminar en un segundo paso los restos que quedan con la ayuda de una recombinasa selectiva (H. Gu y col., Cell 73, 1155-1164 (1993)). En este procedimiento se elimina selectivamente el resto que queda y, al contrario que en el procedimiento de "Hit and Run" descrito en el documento WO 91/19796, sólo puede producirse la recombinación deseada.

En una forma de realización preferida de la presente invención, el vehículo de recombinación marcado de forma seleccionable es el plásmido pTZ2-CkN (PA-) (DSM 7211).

Según el procedimiento mencionado en último lugar, los clones celulares transfectados de forma estable de acuerdo con la invención se inyectan en blastocitos de ratón, estos blastocitos se transfieren a madres de alquiler, los ratones quiméricos nacidos se aparean y se seleccionan sus descendientes respecto a la presencia de la mutación.

Son igualmente objeto de la presente invención los ratones transgénicos homocigotos que se pueden obtener de esta manera.

El objeto de la presente invención es asimismo el uso de los ratones transgénicos homocigotos mutados selectivamente para la producción de anticuerpos monoclonales humanizados.

La invención se explica con más detalle mediante las siguientes figuras:

Fig. 1: Vista general de la recombinación homóloga que conduce al reemplazo de la cadena kappa murina (mC κ) por la cadena kappa humana (HC κ). En la fila superior se muestra el segmento génico original de la región constante de la cadena kappa de ratón, en la fila central el vector usado para la modificación selectiva y en la fila inferior la nueva estructura génica generada en la que el segmento génico mC κ (recuadro sombreado) se ha sustituido funcionalmente por el segmento génico HC κ (recuadro negro). Además están dibujados los sitios de corte para las enzimas de restricción que se han usado bien para la construcción del vector o bien para la detección del segmento génico modificado (B, BamHI; E, Eco RI; H, Hpa I; M, Mst II; Bg, Bgl II; K, Kpn I). Asimismo están dibujadas las sondas de ADN usadas para los análisis de inmunotransferencia de Southern (sonda A y sonda B), así como el fragmento obtenido para el tipo natural y para el gen mutado. En la fila inferior se muestran los cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa usados para buscar células en las que se haya producido la recombinación homóloga deseada.

Fig. 2: Detección de la expresión de la cadena kappa del hombre en lugar de la cadena kappa de ratón en el mutante murino (HC κ /HC κ). Se tiñeron células de bazo de un ratón de tipo natural (WT/WT; lado izquierdo) con anticuerpos de fluorescencia roja contra el antígeno específico de células B CD45R [B220] así como con anticuerpos de fluorescencia verde contra las cadenas kappa de ratón (arriba) o contra las cadenas kappa del hombre (abajo). Estas células se analizaron en un citómetro de flujo. El resultado del análisis se representa en un diagrama de puntos bidimensional. Un punto representa la fluorescencia de una célula. Si una célula no está marcada, ésta aparece abajo a la izquierda de este diagrama. Una célula únicamente con fluorescencia roja aparece arriba a la izquierda, una únicamente con fluorescencia verde aparecería abajo a la derecha y las células que llevan ambas fluorescencias, arriba a la derecha.

Fig. 3: Vista general de la recombinación homóloga que conduce al reemplazo del gen murino que codifica la región constante del gen de IgG1 por el segmento génico humano correspondiente usando una recombinasa (CRE) en un segundo paso de reacción.

a: Se representa la región del gen de IgG1 murino antes de la modificación prevista. Los recuadros negros muestran los exones del gen de IgG1 murino. Los símbolos B y X representan sitios de corte para las enzimas de restricción BamHI y XbaI.

b: Se muestra la situación después de la sustitución funcional de la región de IgG1 de ratón por el segmento génico correspondiente del hombre (recuadros sombreados). Los triángulos negros designan las secuencias de reconocimiento LoxP que flanquean los marcadores de selección neo y HSV-tk así como restos del gen de IgG1 murino.

c: Se muestra la situación después de eliminar la región flanqueada por LoxP mediante la recombinasa Cre.

El procedimiento de acuerdo con la invención permite sustituir en un solo paso genes de anticuerpos o segmentos génicos en la vía germinativa de ratones por un gen de anticuerpo homólogo o un segmento génico de anticuerpo homólogo de un ser humano. De este modo se pueden obtener, a través de quimeras, ratones que son homocigotos para la mutación deseada y que se pueden usar para la expresión de productos génicos de un ser humano en lugar del gen endógeno y/o para ensayar medicamentos y modelos terapéuticos.

La presente invención se explica con más detalle mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo I

5 Construcción del vector de sustitución génica

1) El plásmido pTZ-HC κ se construyó insertando un fragmento SphI-HhaI de 727 pares de bases que contenía el exón C κ y procedía del vector pC-2 (H.-G. Klobeck y col., Immunoglobulin genes of the κ light chain type from to human lymphoid cell lines are closely related. Nucleic Acids Research 12, 6995-7006 (1984)) entre los sitios de corte SphI y PstI del policonector del plásmido pTZ-19(R) (Pharmacia LKB, n° de catálogo 27-4986-01, Pharmacia LKB GmbH, apartado de correos 5480, Munzinger Str. 9, 7800 Freiburg).

2) El plásmido pTZ-HC κ -mC κ 5' se construyó insertando entre los sitios de corte HindIII y SphI del plásmido pTZ-HC κ un fragmento HindIII-MstII de 1,2 kb procedente del vector pHBC κ (S. Lewis y col., Continuing Kappa-Gene Rearrangement in a cell line transformed by abelson murine leukemia virus; Cell 30, 807-816 (1982)) y que contenía el elemento potenciador del intrón.

3) El plásmido pTZ-5'HC κ Neo se construyó insertando un fragmento XHOI-BamHI de 1,1 kb que contenía el gen de resistencia a neomicina del plásmido pMCiNeo (Stratagene, n° de catálogo 213201, Stratagene GmbH, apartado de correos 105466, Im Weiher 12, 6900 Heidelberg) entre los sitios de corte SalI y BamHI del vector pTZ-HC κ -mC κ 5'.

4) El plásmido pTZ-5'HRC κ Neo se construyó insertando en el sitio de corte HindIII del plásmido pTZ-5'HC κ Neo un fragmento HindIII de 2,8 kb procedente del plásmido pHJ κ (S. Lewis y col., en el lugar citado) y que contenía los elementos J 1-5.

5) El plásmido pTZ₂-C κ N (PA⁻) (DSM 7211), que se usó para la sustitución génica, contiene adicionalmente entre los sitios de corte BamHI y KpnI del plásmido pTZ-5'-HRC κ Neo un fragmento de 427 pb amplificado a partir de ADN de la vía germinativa de ratón con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa. Para amplificar este fragmento a partir de ADN de la vía germinativa de ratón se usaron los siguientes cebadores:

5'-CAGGATCCAACTGTATCCATC hibrida 12 pares de bases más allá del inicio del exón C κ ; 5'-GAGGTAC CAAGGAAAGGGAGG hibrida 137 pares de bases más allá del codón de terminación TAG del exón C κ .

Recombinación homóloga

El procedimiento de la recombinación homóloga con la ayuda de vectores de reemplazo que se usa en el laboratorio del solicitante se ha descrito varias veces (Kitamura y col., Nature 1991; Kühn y col., Science 1991; Kitamura y col., Cell 1992). El vector usado para la recombinación homóloga contiene un segmento de ADN genómico de 4,5 kb del gen kappa murino (mC κ). Esta parte contiene los segmentos génicos J κ 1-5, el potenciador del intrón kappa y la región no traducida situada 3' del gen mC κ sin el sitio de poliadenilación. Se insertaron el gen kappa humano (HC κ) y el gen de neomicina necesario para la selección que carecía de sitio de poliadenilación propio entre los sitios de corte de restricción MstII y HpaI y se eliminó el sitio donador de empalme de mC κ situado entre MstII y HpaI (fig. 1). Puesto que el gen de neomicina no lleva un sitio de poliadenilación propio en el vector, se selecciona respecto a un acontecimiento de recombinación homóloga (sólo se puede generar un clon celular resistente a neomicina si el vector se integra en el genoma delante de un sitio de poliadenilación. Este caso se da, por ejemplo, cuando el vector se integra de forma homóloga como está previsto). El vector se linealizó, se introdujo por electroporación en células madre embrionarias (ME) de ratón y se identificaron las células ME resistentes a neomicina que llevaban el acontecimiento de recombinación homóloga mediante la reacción en cadena de la polimerasa (fig. 1) y inmunotransferencia de Southern siguiente (fig. 1). Se transfectaron 2 x 10⁷ células ME en un experimento. Una de cada 480 células ME resistentes a neomicina portaba la mutación prevista (fig. 1).

Para estudiar la expresión de la modificación prevista se generaron ratones quiméricos con la ayuda de un clon celular ME. Estos ratones quiméricos se aparearon con ratones C57BL/6. En la generación siguiente se aparearon ratones que portaban la mutación. En la generación que sigue nacen ratones que llevan dos loci kappa de ratón inalterados (WT) (25%), ratones que llevan dos loci mutados (HC κ) (25%), así como ratones que llevan un locus kappa de ratón inalterado y un locus mutado (50%). A continuación se muestra la comparación entre un ratón de tipo natural (WT/WT) y un ratón homocigoto para la mutación (HC κ /HC κ).

Para demostrar que en el mutante murino homocigoto se usa el gen HC κ para la formación de anticuerpos se determinó serológicamente en el suero de los ratones la concentración de anticuerpos que llevaban la región constante del gen kappa humano. En un ratón de tipo natural no se pueden detectar anticuerpos de este tipo. El límite de detección se encuentra en 250 ng/ml. En los sueros de ratones que llevan un HC κ se encuentra una concentración de 178 μ g/ml y en los ratones homocigotos para esta mutación, una concentración de 2.860 μ g/ml. Como comparación: Un suero normal del hombre contiene aproximadamente 15.000 μ g/ml.

La prueba directa de que el gen HC κ sustituye funcionalmente el gen mC κ la proporciona un análisis de las células productoras de anticuerpos (linfocitos B) en el ratón. Los linfocitos B en reposo portan en su superficie los anticuerpos que se expresan en su genoma una vez realizada la transposición génica. Estos anticuerpos se pueden

detectar mediante anticuerpos marcados específicos de cadenas ligeras. En la fig. 2 se muestra un experimento en el que se usaron anticuerpos específicos de la cadena kappa de ratón o de la cadena kappa del hombre. Para marcar los linfocitos B, las células se marcaron con un anticuerpo de fluorescencia roja que reconoce todas las células B (anti-CD45R[B220]). Al mismo tiempo se marcaron las células con un anticuerpo de fluorescencia verde específico de la región constante de la cadena ligera kappa. Se aprecia que en el mutante murino los linfocitos B expresan anticuerpos con la cadena kappa humana, mientras que la cadena kappa del ratón ya no se usa.

Ejemplo II

Construcción del vector de sustitución génica

1) Para la construcción del vector pG1 se aisló en primer lugar por PCR el plásmido pG1A que codifica la región homóloga del brazo corto de IgG1 y que contiene el gen γ_1 de ratón y sus regiones flanqueantes. Para ello se sometió una mezcla que contenía 10 pmoles de cada uno de los siguientes cebadores

TTATCGATACAGAGGCTCAACCTACAAA y

CCAAGCTTCGCTACTTTTGCACCCTT, así como 10 ng del ADN plasmídico como molde, a 25 ciclos de 94°C (1 min), 69°C (1,5 min) y 74°C (2 min). Para la producción del vector p5'-HROGNT se clonó la región homóloga así aislada en un casete neo^r-tk (H. Gu y col., Cell 73, 1155-1164 (1993)) que presentaba un sitio Frt (O'Gorman y col., Science 251, 1351 (1991)) en el extremo 5'. El vector p5'-HROGNT se digirió parcialmente con BamHI y seguidamente con XhoI. Se aisló del plásmido pGHI (H. Gu y col., Cell 73, 1155-1164 (1993)) un fragmento BamHI-XhoI de 1,2 kb que contenía un gen neo^r con un sitio loxP en su extremo 5' y se clonó en el vector p5'-HROGNT digerido para la producción del vector pG1.

2) Para la producción del vector pG2 se subclonó el gen γ_1 humano, que codifica la forma secretora de la IgG1 humana, en el vector pG1. Para ello se aisló del plásmido pTJ1B (A. Kudo y col., Gene 33, 181 (1985)) un fragmento HindIII-PvuII de 2,1 kb que contenía el gen γ_1 humano. Del plásmido pG1 se aisló otro fragmento que contenía el gen neo^r y una parte del gen tk mediante digestión con XhoI, relleno siguiente con la polimerasa T₄ y digestión con BglII. Asimismo se digirió el vector pG1 parcialmente con HindIII y seguidamente con XhoI-BglII. Estos tres fragmentos se ligaron para la construcción del vector pG2.

3) Para la construcción del vector pG3 se subclonó un sitio loxP delante del exón de γ_1 de membrana de ratón. Para ello se digirieron parcialmente el plásmido pTZ-3' γ_1 (4.3) y el plásmido pGEM30 (H. Gu y col., Cell 73, 1155-1164 (1993)) con EcoRI y seguidamente con SalI y se ligaron entre sí. El plásmido pTZ-3' γ_1 (4.3), que contiene dos exones del gen γ_1 de membrana de ratón, se preparó a partir de un fragmento SacI-EcoRI de 1,5 kb del plásmido pG1A y un fragmento EcoRI de 2,8 kb del bacteriófago ch γ_{1-3} (A. Shimizu y col., Cell 28, 499 (1982)).

4) Para la construcción de la región 3' homóloga completa del vector de sustitución génica se digirió el vector pGH2, que contenía un fragmento de ADN genómico XbaI-EcoRI de 6,3 kb que incluía el gen γ_1 murino en las formas secretora y membranal, con SacI, se relleno con la polimerasa T₄ y después se digirió con BglII. El vector pG3 se cortó con XhoI, se relleno con la polimerasa T₄ y después se cortó con BglII y SphI. Para la construcción del vector pG4 se ligaron ambos fragmentos así obtenidos.

5) Para la construcción del vector de sustitución génica pG5 se cortó el vector pG4 con ClaI y XhoI y el vector pG2 con ClaI y SalI y después se ligaron entre sí.

Recombinación homóloga

Para la recombinación homóloga se linealizó el vector pG5 por digestión con ClaI y se introdujo en células madre embrionarias de ratón por electroporación como se ha descrito en el ejemplo 1.

Después, en un paso adicional, se expresó la recombinasa de forma transitoria en las células madre embrionarias (H. Gu y col., Cell 73, 1155-1164 (1993)). La recombinasa elimina entonces muy eficazmente la región marcada con la secuencia de reconocimiento (figura 3). A continuación se generó de forma análoga al ejemplo I a través de ratones quiméricos un mutante murino que era homocigoto para la mutación.

La prueba de que el gen murino que codifica la región constante del gen de IgG1 ha sido sustituido por la región correspondiente del gen humano se proporcionó mediante la detección de IgG1 humana en cultivos de células B de los ratones quiméricos correspondientes: En los cultivos de tres ratones se midieron en cada caso concentraciones de 2 μ g/ml de IgG1 humana, mientras que en los cultivos control los valores permanecieron por debajo del límite de detección de 0,1 μ g/ml.

Estos ejemplos demuestran que la recombinación homóloga permite sustituir funcionalmente en un solo paso genes o segmentos génicos homólogos de mamíferos (en este caso del hombre) en la vía germinativa de mamíferos no humanos (en este caso del ratón). Asimismo se puede obtener, apareando un ratón del ejemplo I con un ratón del ejemplo II, un mutante murino en el que tanto el gen κ como el gen γ_1 provienen del hombre. Un mutante murino de este tipo es, por lo tanto, adecuado para la producción de anticuerpos monoclonales humanizados.

ES 2 297 828 T3

El plásmido (pTZ₂-CkN (PA⁻) usado para la sustitución génica se ha depositado en la “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH” (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), Maschorder Weg 1b, W-3300 Braunschweig, como cepa de *E. coli* DSM 7211.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la generación de un ratón transgénico homocigoto mediante recombinación homóloga, que comprende la sustitución de un gen de anticuerpo o de un segmento génico de anticuerpo en la vía germinativa del ratón por un gen de anticuerpo homólogo o un segmento génico de anticuerpo homólogo de un ser humano, en el que

(i) se transfecta la línea celular madre embrionaria del ratón con un vehículo de recombinación marcado de forma seleccionable, siendo el vehículo de recombinación un vector de reemplazo y comprendiendo éste el segmento génico homólogo que se ha de insertar o el gen homólogo que se ha de insertar, secuencias homólogas a las secuencias que flanquean el segmento de ADN endógeno que se ha de sustituir y un gen marcador, y sustituyéndose en el acontecimiento de recombinación funcionalmente el gen endógeno o el segmento génico endógeno en un solo paso por el gen homólogo o el segmento génico homólogo con la ayuda del vehículo de recombinación marcado de forma seleccionable;

(ii) se seleccionan los clones celulares transfectados de forma estable que presentan el gen marcador; y

(iii) éstos se seleccionan selectivamente por PCR y/o transferencia de Southern.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que

(i) el gen marcador en el vehículo de recombinación marcado de forma seleccionable se selecciona entre neomicina e higromicina y es en especial neomicina, y/o

(ii) el vehículo de recombinación contiene además secuencias génicas funcionales adicionales, en especial secuencias de reconocimiento virales, secuencias para la intensificación de la expresión génica y secuencias diana para sistemas de recombinación pro- y eucariotas, en especial la secuencia de reconocimiento LoxP para Cre y la secuencia de reconocimiento Frt para FLP.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el gen marcador es neomicina.

4. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque el vehículo de recombinación marcado de forma seleccionable es pTZ2-CkN (PA-) (DSM 7211).

5. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque mediante las secuencias diana se eliminan en un segundo paso de reacción los genes marcadores y segmentos de genes diana aún presentes.

6. Ratón transgénico homocigoto que se puede obtener mediante un procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Uso del ratón homocigoto según la reivindicación 6 para la expresión de anticuerpos monoclonales humanizados.

Fig. 1

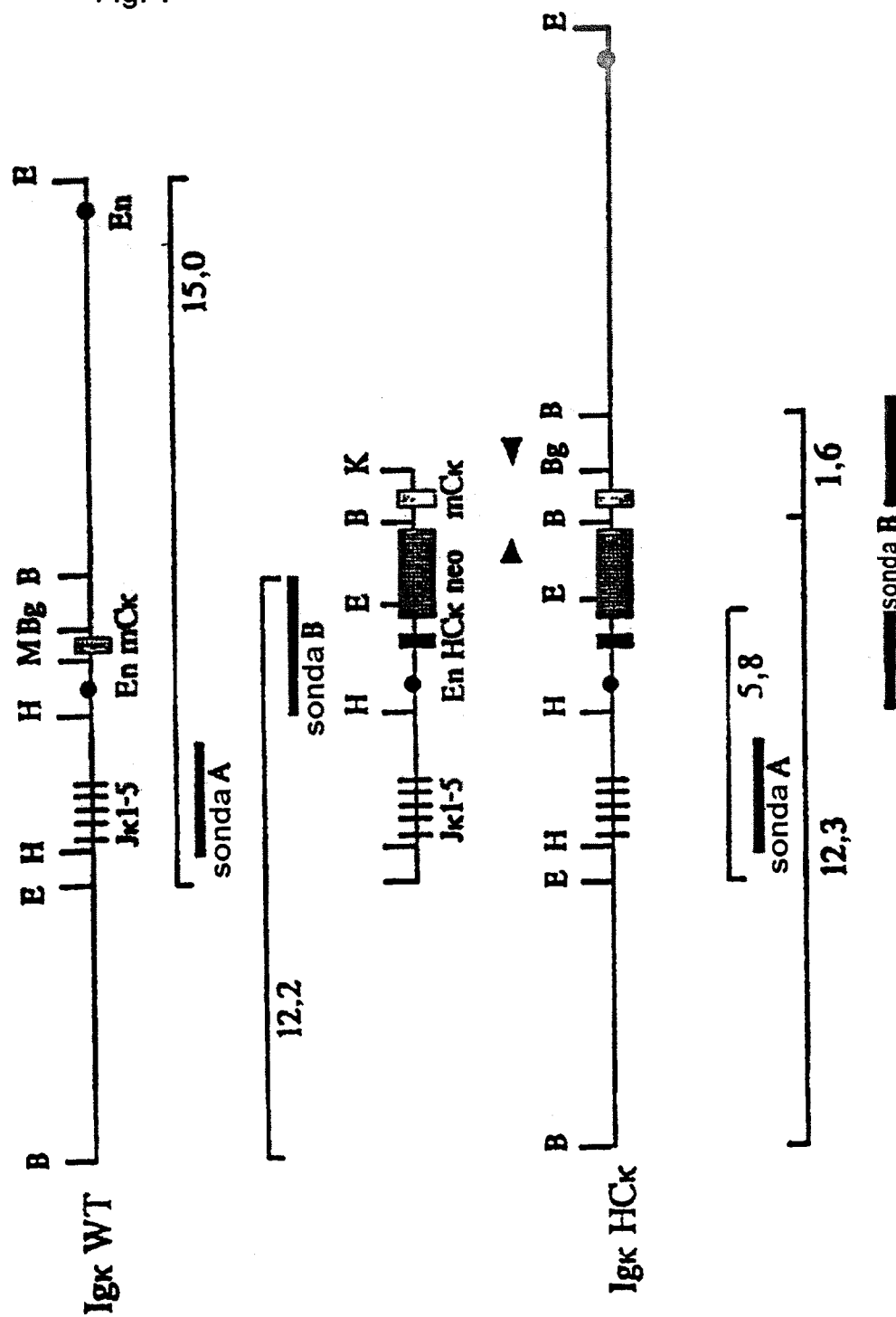


Fig. 2

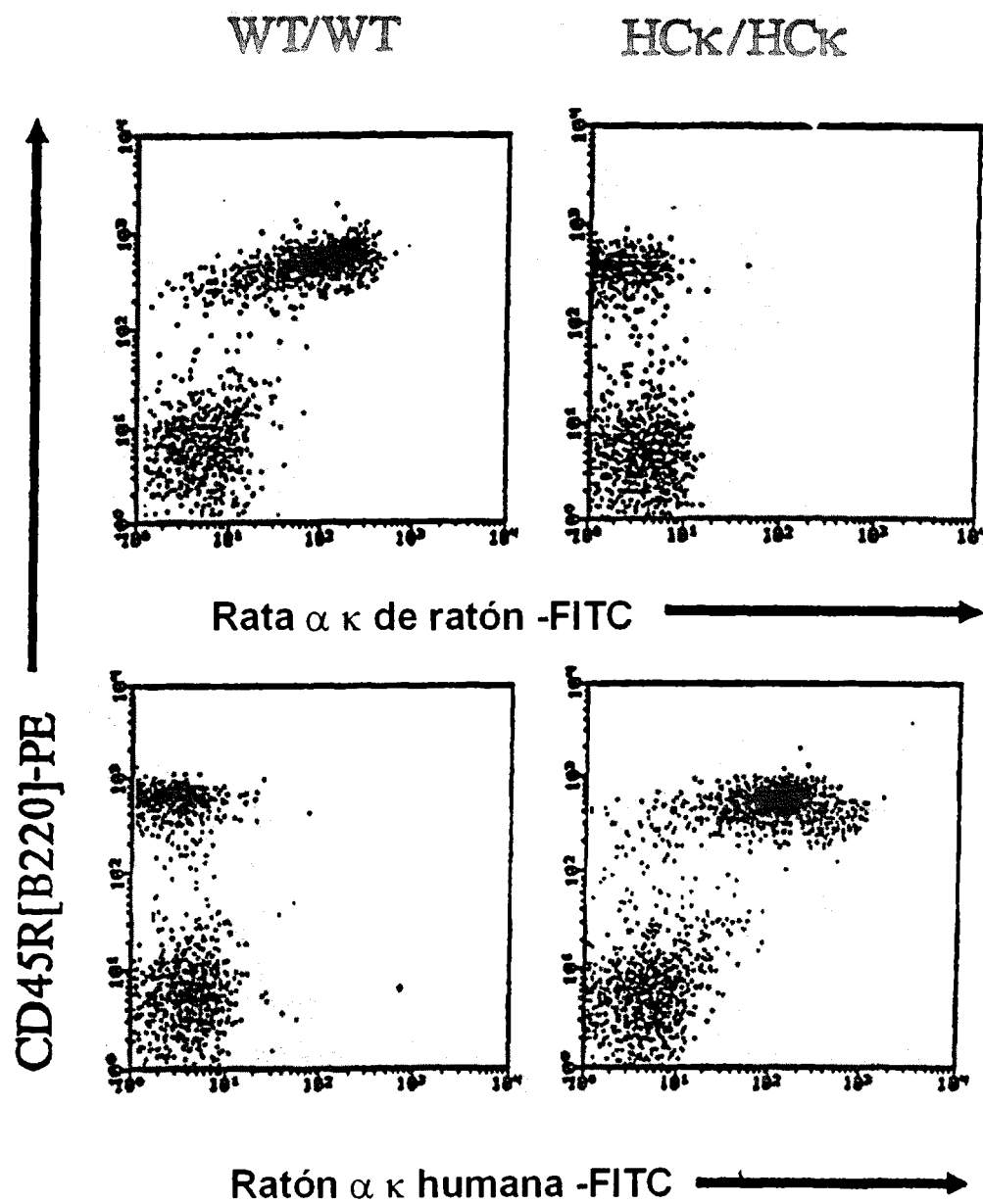
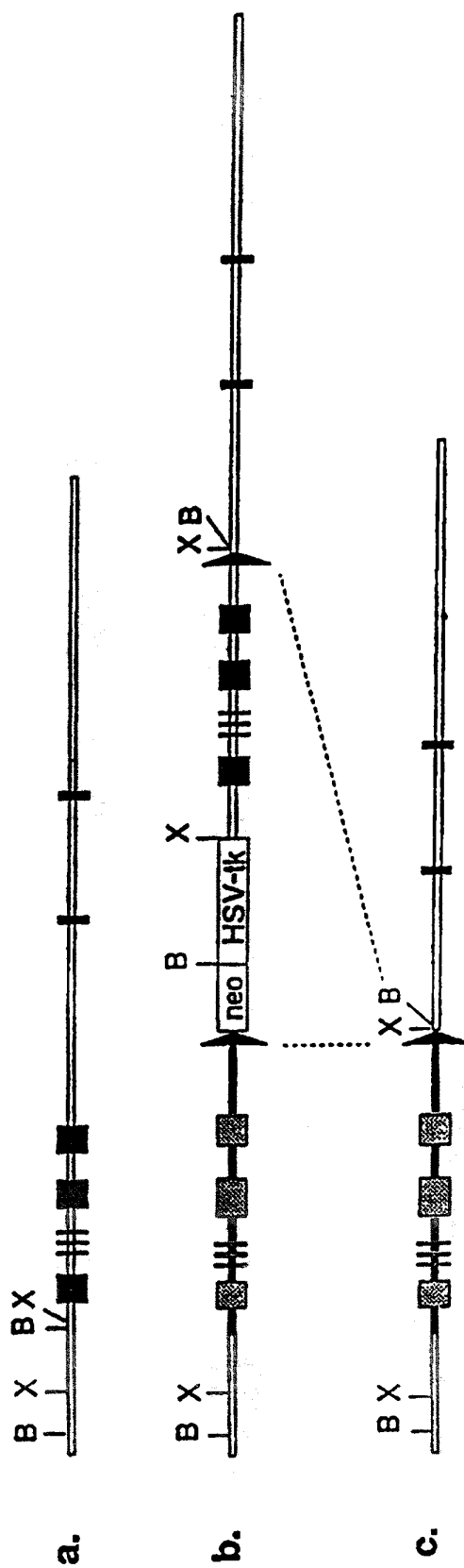


Fig. 3



LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: Klaus Rajewsky
- (B) CALLE: Bachemer Straße 95
- 10 (C) LUGAR: Colonia
- (E) PAÍS: Alemania
- (F) CÓDIGO POSTAL: 50931
- 15 (ii) TÍTULO DE LA SOLICITUD: Procedimiento para la sustitución de segmentos génicos homólogos de mamíferos en la vía germinativa de mamíferos no humanos
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4
- (iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 20 (A) SOPORTE DE DATOS: Disquete
- (B) ORDENADOR: PC compatible con IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- 25 (D) SOFTWARE: PatentIn Release nº 1.0, versión nº 1,25 (EPA)

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID SEC Nº: 1:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) FORMA DE HEBRA: desconocida
- 35 (D) TOPOLOGÍA: desconocida
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº 1:
- 40 CAGGATCCAA CTGTATCCAT C

21

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID SEC Nº: 2:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- 50 (C) FORMA DE HEBRA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº 2:
- GAGGTACCAA GGAAAGGGAG G

21

60 (2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID SEC Nº 3:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 28 pares de bases
- 65 (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) FORMA DE HEBRA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

ES 2 297 828 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 3:

5 TTATCGATAC AGAGGCTCAA CCTACAAA 28

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID SEC N°: 4:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

15 (C) FORMA DE HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 4:

CCAAGCTTCG CTACTTTTGC ACCCTT 26

25

30

35

40

45

50

55

60

65