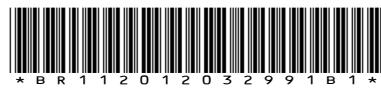




República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112012032991-0 B1



(22) Data do Depósito: 22/06/2011

(45) Data de Concessão: 10/08/2021

(54) Título: MÉTODO PARA PREPARAR UM ANTICORPO QUE SE LIGA A UM ANTÍGENO DE INTERESSE

(51) Int.Cl.: C12N 15/85; A01K 67/027; C07K 16/00; C07K 16/46.

(30) Prioridade Unionista: 22/06/2010 US 61/357,314; 22/06/2010 US 61/357,317.

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

(72) Inventor(es): LYNN MACDONALD; SEAN STEVENS; CAGAN GURER; ANDREW J. MURPHY; KAROLINA A. HOSIAWA.

(86) Pedido PCT: PCT US2011041370 de 22/06/2011

(87) Publicação PCT: WO 2011/163314 de 29/12/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/12/2012

(57) Resumo: CAMUNDONGO DE CADEIA LEVE HÍBRIDA. A presente invenção refere-se aos camundongos geneticamente modificados que expressam as sequências variáveis ... (hV), incluindo os camundongos que expressam as sequências HV de um local da cadeia leve de camundongo endógeno, os camundongos que expressam as sequências HV a partir de um local de cadeia leve ... de camundongo endógeno, e os camundongos que expressam as sequências hV... de um transgene ou um episoma em que a sequência HV ... está ligada a uma sequência de camundongo constante. Os camundongos fornecidos são uma fonte de sequências variáveis humanas somaticamente mutadas úteis para fazer as proteínas de ligação aos抗ígenos. As composições e métodos para fazer as proteínas de ligação ao抗ígeno que compreendem as sequências variáveis humanas, incluindo os anticorpos humanos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO PARA PREPARAR UM ANTICORPO QUE SE LIGA A UM ANTÍGENO DE INTERESSE".

[0001] A presente invenção refere-se aos camundongos geneticamente modificados que compõem uma sequência da cadeia leve Variável lambda de camundongo ou humana (V λ) ligada operativamente com um camundongo ou uma região de cadeia leve humana constante (λ ou kappa (k)). Os camundongos geneticamente modificados que expressam as proteínas de ligação aos epítópos que compreendem uma cadeia leve de imunoglobulina que compreende um domínio Variável derivada de um segmento de gene Variável lambda humano (hV λ), um segmento de gene lambda humano J (hJ λ), e um domínio da cadeia leve constante de camundongo (C_L). Os camundongos geneticamente modificados, que compreendem uma sequência de ácido nucleico variável de cadeia leve lambda (λ) de imunoglobulina não rearranjada em sítio da cadeia leve de camundongo endógenos. Os camundongos capazes de rearranjar e expressar um quimérico uma cadeia leve de camundongo/ λ humana a partir de local endógeno da cadeia leve que compreende uma substituição de todos os segmentos de genes da região Variável da cadeia leve de camundongo endógeno com um ou mais segmentos de gene hV λ . e um ou mais segmentos de genes hJ λ . Os anticorpos mutados somaticamente compreendem os domínios hV λ e os domínios C_L camundongo.

ANTECEDENTES

[0002] Os camundongos que expressam anticorpos que são totalmente humanos, ou parcialmente humanos e parcialmente camundongo, são conhecidos na técnica. Por exemplo, os camundongos transgênicos que expressam os anticorpos completamente humanos a partir de transgenes contendo os genes das

regiões variáveis de imunoglobulina da cadeia leve e da cadeia pesada humana têm sido relatados. Os camundongos geneticamente modificados que compõem uma substituição dos segmentos de genes da região Variável da cadeia pesada do camundongo endógeno (HCVR) e segmentos de genes da região Variável da cadeia leve kappa (K) (LCVR) com segmentos dos genes HCVR humana e LCVR e que produzem os anticorpos quiméricos com uma cadeia kappa humana/camundongo quimérica são conhecidos também.

[0003] As cadeias leves de anticorpos são codificadas por meio de um dos dois locais separados: kappa (x) e lambda (λ). As cadeias leves de anticorpos de camundongo são principalmente do tipo K. A relação da utilização da cadeia leve K a λ em seres humanos é de cerca de 60:40, enquanto que nos camundongos que é cerca de 95:5. A utilização tendenciosa das cadeias leves k em camundongos é declaradamente sustentada em camundongos geneticamente modificados capazes de expressar os anticorpos total ou parcialmente humanos. Dessa maneira, os camundongos que expressam os anticorpos total ou parcialmente humanos parecem ser limitados na utilização variável lambda (λ).

[0004] Há uma necessidade na técnica para gerar as regiões Variáveis lambda, quer do camundongo ou humano, para utilização na fabricação de proteínas de ligação ao epítopo. Existe uma necessidade na técnica para camundongos que expressam os anticorpos totalmente ou parcialmente humanos, em que os camundongos exibem um aumento da utilização da variável lambda ($V\lambda$).

[0005] Há uma necessidade na técnica para camundongos que expressam os anticorpos totalmente ou parcialmente humanos, em que os camundongos exibem a utilização aumentada da variável λ ($V\lambda$).

SUMÁRIO

[0006] Os camundongos geneticamente modificados, embriões,

células, tecidos, bem como os construtos de ácido nucleico para camundongos modificadores, e métodos e composições para fazer e utilizá-los, são fornecidos. Os camundongos e as células que geram as regiões Variáveis lambda (λ) (humanas ou não a humanas), no contexto de uma cadeia leve kappa (K) são fornecidos. Os camundongos e as células que produzem as regiões variáveis humanas λ , no contexto de uma cadeia leve K ou λ , por exemplo, a partir de local de camundongo da cadeia leve endógeno, também são fornecidos. Também são fornecidos os métodos para a preparação de anticorpos que compreendem as regiões Variáveis de lambda λ . Os métodos para selecionar as cadeias pesadas que expressam com as regiões Variáveis cognatas lambda também são fornecidos.

[0007] As proteínas de ligação ao antígeno quimérico humano (por exemplo, anticorpos) e os ácidos nucleicos que os codificam, são fornecidos os quais compreendem as regiões Variáveis somaticamente mutadas, incluindo os anticorpos que possuem as cadeias leves compreendendo um domínio Variável derivado a partir de um segmento de gene humano $V\lambda$ e $J\lambda$ humano fundido com um domínio de cadeia leve constante de camundongo.

[0008] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que expressa sequência da região variável λ humana de uma cadeia leve que compreende uma região constante de camundongo. Em um aspecto, é fornecido um camundongo que expressa uma sequência da região variável de cadeia leve humana λ que compreende uma região constante k. Em um aspecto, é fornecido um camundongo que expressa a partir de local de camundongo da cadeia leve endógeno de uma cadeia leve que compreende uma sequência da região variável λ humana. Em um aspecto, um camundongo é fornecido que compreende um gene de cadeia leve rearranjado que compreende uma sequência variável humana λ ligada a uma sequência de região constante de

camundongo e, em uma modalidade, a sequência da região constante de camundongo é uma sequência λ constante, em uma modalidade, a sequência da região constante camundongo é uma sequência K constante.

[0009] Em um aspecto, um camundongo geneticamente modificado é proporcionado, em que o camundongo compreende um segmento de gene Variável de cadeia leve λ humano não rearranjados (hV λ) e um segmento de gene λ humano de ligação (hJ λ). Em uma modalidade, o hV λ não rearranjado e hJ λ estão em um sítio de cadeia leve de camundongo. Em uma modalidade, o hV λ não rearranjado e hJ λ não rearranjado estão em um transgene e operativamente ligado a uma sequência da região constante de camundongo ou humana. Em uma modalidade, o hV λ não rearranjado e hJ λ não rearranjado está em um epissoma. Em uma modalidade, o camundongo é capaz de fazer uma imunoglobulina que compreende uma cadeia leve que é obtida a partir de uma sequência hV λ e uma sequência hJ λ não rearranjada, e uma sequência de ácido nucleico da região constante de cadeia leve camundongo (C_L). Os métodos e as composições para fazer e usar os camundongos geneticamente modificados também são fornecidos.

[00010] Os anticorpos que são fornecidos compreendem (a) um domínio variável da cadeia pesada humana (hV λ) fundido a uma região de cadeia pesada de camundongo constante, e (b) um hV λ humano, fundido com um domínio de camundongo CL, incluindo onde um ou mais dos domínios Variáveis estão somaticamente mutados, por exemplo, durante a seleção de anticorpos ou células imunitárias de um camundongo da presente invenção. Em uma modalidade, o hJ λ não rearranjado e hV λ não rearranjado está operacionalmente ligado a uma região K constante humana ou camundongo (CK). Em uma modalidade, o hJ λ não rearranjado e hV λ não rearranjado está operacionalmente ligado a uma região constante λ humana ou camundongo (C_k).

[00011] Em um aspecto, um camundongo que é fornecido compreende, na sua linhagem germinativa, sítio de cadeia leve de camundongo endógeno, uma sequência da região Variável a cadeia leve humana λ , em que a sequência da região Variável lambda humana é expressa em uma cadeia leve que compreende uma sequência do gene da região constante de imunoglobulina de camundongo.

[00012] Em uma modalidade, o sítio da cadeia leve de camundongo endógeno é um sítio λ . Em uma modalidade, o sítio da cadeia leve de camundongo endógeno é um sítio K.

[00013] Em uma modalidade, o camundongo não tem uma sequência variável de cadeia leve endógena no sítio da cadeia leve de camundongo endógeno.

[00014] Em uma modalidade, toda ou substancialmente todos os segmentos de genes da região Variável da cadeia leve de camundongo endógeno são substituídos com um ou mais Segmentos de genes da região variável λ humana.

[00015] Em uma modalidade, sequência da região variável da cadeia leve humana λ compreende uma sequência de $J\lambda$ humana. Em uma modalidade, a sequência $J\lambda$ humana é selecionada a partir do grupo consistindo em $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$, $J\lambda 7$, e uma combinação dos mesmos.

[00016] Em uma modalidade, a sequência da região Variável da cadeia leve humana λ compreende um fragmento do grupo A do sítio da cadeia leve humana. Em uma modalidade específica, o fragmento do grupo A do sítio da cadeia leve λ humana estende a se desde $hV\lambda 3$ a 27 através $hV\lambda 3$ a 1.

[00017] Em uma modalidade, a sequência da região Variável a cadeia leve λ humana, compreende um fragmento do grupo B do sítio da cadeia leve humana λ . Em uma modalidade específica, o fragmento do grupo B do sítio da cadeia humana leve λ estende a se desde $hV\lambda 5$ a 52 através de $hV\lambda 1$ a 40.

[00018] Em uma modalidade, a sequência da região variável da cadeia leve humana λ comprehende um fragmento do gene do grupo A e um fragmento do gene do grupo B. Em uma modalidade a sequência da região variável da cadeia leve λ humana comprehende pelo menos um segmento de gene do grupo A e, pelo menos, um segmento de gene do grupo B.

[00019] Em uma modalidade, mais do que 10 % do repertório da cadeia leve de camundongo ingênuo é derivada de pelo menos dois segmentos de genes hV λ , selecionados a partir de 2 a 8, 2 a 23, 1 a 40, 5 a 45, e 9 a 49. Em uma modalidade, mais de 20 % do repertório da cadeia leve de camundongo ingênuo é derivado de pelo menos três segmentos de genes selecionados a partir de hV λ 2 a 8, 2 a 23, 1 a 40, 5 a 45, e 9 a 49. Em uma modalidade, mais do que 30 % do repertório da cadeia leve do camundongo ingênuo é derivado de pelo menos quatro segmentos de genes selecionados a partir de hV λ 2 a 8, 2 a 23, 1 a 40, 5 a 45, e 9 a 49.

[00020] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que expressa uma cadeia leve de imunoglobulina que comprehende uma sequência Variável k humana fundida com uma região constante de camundongo, em que o camundongo apresenta uma utilização de K para λ na proporção de utilização de cerca de 1:1.

[00021] Em uma modalidade, a cadeia leve de imunoglobulina é expressa a partir de um sítio da cadeia leve de camundongos endógenos.

[00022] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que comprehende uma sequência de região da cadeia leve variável λ (hV λ), e pelo menos uma sequência J (J), contígua com uma sequência da região constante da cadeia leve de camundongo K.

[00023] Em uma modalidade, o camundongo não tem um segmento de gene de camundongo VK funcional e/ou um camundongo J κ .

[00024] Em uma modalidade, o V λ é um V λ humano (hV λ), e a J é um J humano λ J λ (hJ λ). Em uma modalidade, o hV λ e o hJ λ são os segmentos de gene não rearranjados.

[00025] Em uma modalidade, o camundongo comprehende uma pluralidade de segmentos de gene hV λ não rearranjados e, pelo menos, um segmento de gene hJ λ . Em uma modalidade específica, a pluralidade de segmentos de gene hV λ não rearranjados são pelo menos 12 segmentos do gene, pelo menos, 28 segmentos de genes, ou pelo menos 40 segmentos de genes.

[00026] Em uma modalidade, pelo menos um segmento de gene hJ λ é selecionado a partir do grupo que consiste em J λ 1, J λ 2, J λ 3, J λ 7, e uma combinação dos mesmos.

[00027] Em uma modalidade, um sítio de cadeia leve de camundongo endógeno é eliminado em todo ou em parte.

[00028] Em uma modalidade, a sequência da região constante da cadeia leve do camundongo K encontra a se em sítio da cadeia leve de camundongo endógeno K.

[00029] Em uma modalidade, cerca de 10 % a cerca de 45 % das células B do camundongo expressam um anticorpo que comprehende uma cadeia leve que comprehende um domínio Variável da cadeia leve λ humana e um domínio constante da cadeia leve k de camundongo (CK).

[00030] Em uma modalidade, o domínio variável λ humano é derivado a partir de uma sequência rearranjada hV λ /hJ λ selecionada a partir do grupo consistindo em 3 a 1/1, 3 a 1/7, 4 a 3/1, 4 a 3/7, 2 a 8/1, 3 a 9/1, 3 a 10 / 1, 3 a 10/3, 3 a 10/7, 2 a 14/1, 3 a 19/1, 2 a 23/1, 3 a 25/1, 1 a 40/1, 1 a 40/2, 1 a 40/3, 1 a 40/7, 7 a 43/1, 7 a 43/3, 1 a 44/1, 1 a 44/7, 5 a 45/1, 5 a 45/2, 5 a 45/7, 7 a 46/1, 7 a 46/2, 7 a 46/7, 9 a 49/1, 9 a 49/2, 9 a 49/7 e 1 a 51/1.

[00031] Em uma modalidade, o camundongo comprehende ainda uma

região intergênica humana VK a J_k a partir de um sítio de cadeia leve K humana, em que a região intergênica humana V_k a J a 1c é contígua com a sequência V_k e a sequência J. Em uma modalidade específica, a região intergênica humana V_k a J_k é colocada entre a sequência V_λ e a sequência J.

[00032] Em um aspecto, um camundongo é fornecido que comprehende (a) pelo menos, 12 a, pelo menos, 40 segmentos de genes da região Variável de cadeia leve não rearranjados humanos e pelo menos um segmento de gene humano J_λ em sítio de cadeia leve de camundongo endógeno, (b) uma sequência intergênica de V_k a J_k humana situada entre as, pelo menos, 12 a, pelo menos, 40 segmentos de genes da região Variável de cadeia leve humana a pelo menos uma sequência humana J_λ; em que o camundongo expressa um anticorpo que comprehende uma cadeia leve que comprehende um domínio V_λ humano e um domínio C_K de camundongo.

[00033] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que expressa um anticorpo que comprehende uma cadeia leve que comprehende uma sequência variável λ e uma sequência constante K

[00034] Em uma modalidade, o camundongo exibe uma utilização K para a utilização de λ na proporção de cerca de 1:1.

[00035] Em uma modalidade, uma população de células B imaturas obtidas a partir de medula óssea do camundongo exibe uma utilização K para a utilização de λ de cerca de 1:1.

[00036] Em um aspecto, um camundongo geneticamente modificado é proporcionado, em que o camundongo comprehende um segmento de gene V_λ e J_λ de imunoglobulina não rearranjado operativamente ligado a um gene de cadeia leve de camundongo que comprehende um gene CL de camundongo.

[00037] Em uma modalidade, os segmentos de genes V_λ e/ou J_λ são segmentos de genes humanos. Em uma modalidade, os segmentos de

genes V λ e/ou Jλ são segmentos de genes de camundongo, e o CL é um camundongo de CK.

[00038] Em uma modalidade, o sítio da cadeia leve de camundongo endógeno é um sítio de cadeia leve K. Em uma modalidade, o sítio da cadeia leve de camundongo endógeno é um sítio de cadeia leve λ.

[00039] Em uma modalidade, os segmentos de genes Vλ e Jλ não rearranjado encontram a se em um sítio da cadeia leve de camundongos endógenos.

[00040] Em uma modalidade, os segmentos de gene Vλ e Jλ de imunoglobulina não rearranjado estão em um transgene.

[00041] Em uma modalidade, o camundongo compreende ainda uma substituição de um ou mais segmentos de genes da cadeia pesada V, D, e/ ou J, com um ou mais segmentos de genes V, D, e/ou J humano no sítio da cadeia pesada de uma imunoglobulina de camundongo endógeno.

[00042] Em uma modalidade, o camundongo compreende um segmento do gene Vλ e Jλ de imunoglobulina não rearranjado em um camundongo endógeno κ no sítio da cadeia leve que compreende um gene de camundongo CK.

[00043] Em uma modalidade, o camundongo compreende um segmento de gene variável de cadeia leve de imunoglobulina λ humana rearranjado (Vλ) e um segmento de gene λ juntar (Jλλ) em um sítio de cadeia leve λ endógeno de camundongo que compreende um gene de camundongo Ck.

[00044] Em uma modalidade, a cadeia leve local do gene variável (o "sítio V_L") compreende pelo menos um segmento de gene humano Vλ (hVλ). Em uma modalidade, o sítio V_L compreende pelo menos um segmento de gene humano Jλ (hJλλ). Em uma outra modalidade, V_L lócus compreende até quatro segmentos do gene hJλ. Em uma modalidade, o sítio V_L compreende uma sequência contígua

compreendendo humano e λ sequência de gene humana K.

[00045] Em uma modalidade, o local do gene Variáveis da cadeia leve K ("sítio k") comprehende pelo menos um segmento de gene humano Vλ (hVλ). Em uma modalidade, o sítio K comprehende pelo menos um segmento de gene humano Jλ (hJλ). Em uma modalidade, o sítio K comprehende até quatro segmentos do gene hJλ. Em uma modalidade, o sítio K comprehende pelo menos um hVλ e pelo menos um hJλ e carece ou substancialmente carece de um segmento de gene funcional VK região e não tem, ou substancialmente não tem um segmento de gene da região funcional Jλ. Em uma modalidade, o camundongo comprehende o segmento do gene da região não funcional V_k. Em uma modalidade, o camundongo comprehende nenhum segmento do gene da região funcional J_k.

[00046] Em uma modalidade, o local do gene variável da cadeia leve λ (o "sítio λ") comprehende pelo menos um segmento de gene hVλ. Em uma modalidade, o sítio λ comprehende pelo menos um segmento de gene humano Jλ (hJλ). Em uma outra modalidade, o sítio λ comprehende até quatro segmentos do gene hJλ.

[00047] Em uma modalidade, o sítio VL comprehende uma pluralidade de hVλs. Em uma modalidade, a pluralidade de hVλs é selecionada de modo a resultar na expressão de um repertório da região variável da cadeia leve λ que reflete cerca de 10 %, cerca de 20 %, cerca de 30 %, cerca de 40 %, cerca de 50 %, cerca de 60 %, cerca de 70 %, cerca de 80 %, ou cerca de 90 % ou mais da utilização de Vλ observada em humanos. Em uma modalidade, o sítio V_L comprehende os segmentos de gene de hVλ 1 a 40, 1 a 44, 2 a 8, 2 a 14, 3 a 21, e uma combinação dos mesmos.

[00048] Em uma modalidade, os hVλs incluem 3 a 1, 4 a 3, 2 a 8, 3 a 9, 3 a 10, 2 a 11, e 3 a 12. Em uma modalidade específica, o sítio V_L comprehende uma sequência contínua do sítio da cadeia leve humana λ

que se estende a partir de VK3 a 12 a VK3 a 1. Em uma modalidade, o sítio VL comprehende pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 hVλs. Em uma modalidade específica, as hVλs incluem 3 a 1, 4 a 3, 2 a 8, 3 a 9, 3 a 10, 2 a 11, e 3 a 12. Em uma modalidade específica, o sítio VL comprehende uma sequência contínua de sítio λ humano que se estende a partir de Vλv3 a 12 a Vλ3 a 1. Em uma modalidade, o sítio VL está no sítio K endógeno. Em uma modalidade específica, o sítio VL está no local endógeno k e o sítio da cadeia leve endógena λ é eliminado em parte ou totalmente. Em uma modalidade, o sítio VL é um sítio λ endógenos. Em uma modalidade específica, o sítio VL está no lugar geométrico λ endógeno e o local endógeno K é eliminado em parte ou totalmente.

[00049] Em uma modalidade, o sítio VL comprehende 13 a 28 ou mais hVλs. Em uma modalidade específica, os hVλs incluem 2 a 14, 3 a 16, 2 a 18, 3 a 19, 3 a 21, 3 a 22, 2 a 23, 3 a 25, e 3 a 27. Em uma modalidade específica, o sítio K comprehende uma sequência contígua de sítio λ humana que se estende a partir de Vλ3 a 27 a VK3 a 1. Em uma modalidade, o sítio VL está no sítio K endógeno. Em uma modalidade específica, o sítio VL está no local endógeno K endógeno e o sítio de cadeia leve λ é eliminado em parte ou totalmente. Em uma outra modalidade, o sítio VL está no sítio λ endógeno. Em uma modalidade específica, o sítio VL endógeno está no sítio λ e o local endógeno K é eliminado em parte ou totalmente.

[00050] Em uma modalidade, o sítio VL comprehende 29 a 40 hVλs. Em uma determinada modalidade, o sítio K comprehende um local da sequência contígua λ humana que se estende a partir de VK3 a 29 a Vλ 3 a 1, e uma local da sequência contígua humana λ que se estende a partir de Vλ 0,5 a 52 para Vλ1 a 40. Em uma modalidade específica, todas ou substancialmente todas as sequência entre hVλ1 a 40 e hVλ3 a 29 no camundongo geneticamente modificado é constituída essencialmente por meio de uma sequência λ humano de

aproximadamente de 959 por encontrada na natureza (por exemplo, na população humana) a jusante do segmento de gene hV λ 1 a 40 (a jusante da extremidade 3' da porção não traduzida), um sítio de enzima de restrição (por exemplo, PI a SCEL), seguido por meio de uma sequência λ humana de aproximadamente 3.431 bp por montante do segmento de gene hV λ 3 a 29 encontrado na natureza. Em uma modalidade, o sítio VL está no lugar geométrico K do camundongo endógeno. Em uma modalidade específica, o sítio VL está no sítio K do camundongo endógeno e no local do camundongo endógeno λ de cadeia leve é eliminado em parte ou totalmente. Em uma outra modalidade, o sítio VL está no sítio λ do camundongo endógeno. Em uma modalidade específica, o sítio VL está no lugar geométrico λ do camundongo endógeno e no sítio K do camundongo endógeno é eliminado em parte ou totalmente.

[00051] Em uma modalidade, o sítio V_L comprehende pelo menos uma hJ λ . Em uma modalidade, o sítio V_L comprehende uma pluralidade de hJ λ s. Em uma modalidade, o sítio V_L comprehende pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, ou 7 hJ λ . Em uma modalidade específica, o sítio VL comprehende quatro hJ λ . Em uma modalidade específica, os quatro hJ λ s são hJ λ 1, hJ λ 2, hJ λ 3 e hJ λ 7. Em uma modalidade, o sítio V_L é um sítio K. Em uma modalidade específica, o sítio V_L está no sítio K endógeno e o Sítio da cadeia leve λ endógeno é eliminado em parte ou totalmente. Em uma modalidade, o sítio VL comprehende uma hJ λ . Em uma modalidade específica, o hJ λ é hJ λ 1. Em uma modalidade, o sítio V_L está no sítio K endógeno. Em uma modalidade específica, o sítio V_L está no local endógeno e o Sítio K da cadeia leve endógena é eliminado em parte ou totalmente. Em uma outra modalidade, o sítio VL está no sítio λ endógeno. Em uma modalidade específica, o sítio VL está no lugar geométrico λ endógeno e o local endógeno K é eliminado em parte ou totalmente.

[00052] Em uma modalidade, o sítio V_L comprehende pelo menos um $hV\lambda$, pelo menos um $hJ\lambda$, e um gene do camundongo CK. Em uma modalidade, o sítio V_L comprehende pelo menos uma $hV\lambda$, pelo menos, um $hJ\lambda$, e um gene Ck de camundongo. Em uma modalidade específica, o gene $C\lambda$ de camundongo $C\lambda$ é $C\lambda2$. Em uma modalidade específica, o gene $C\lambda$ de camundongo $C\lambda$ é de pelo menos 60 %, pelo menos 70 %, pelo menos 80 %, pelo menos 90 %, pelo menos, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, ou pelo menos 99 % idêntica para camundongo $C\lambda2$.

[00053] Em uma modalidade, o camundongo comprehende uma substituição no sítio K de camundongo endógeno de segmentos de genes VK de camundongo endógenas, com um ou mais segmentos do gene $hV\lambda$, em que os segmentos de genes $hV\lambda$ estão ligados operativamente a uma região do gene CK de camundongo endógeno, de tal modo que o camundongo reorganiza os segmentos dos genes humanos e $V\lambda$ expressa uma cadeia leve de imunoglobulina quimérica reversa que inclui um domínio $V\lambda$ humano, e um Camundongo Ck. Em uma modalidade, 90 a 100 % de segmentos de genes $V\lambda$ de camundongo não rearranjado (são substituídos com pelo menos um segmento de gene $hV\lambda$ não rearranjado. Em uma modalidade específica, todos ou substancialmente todos os segmentos de gene VK de camundongo endógenos são substituídos com pelo menos um segmento de gene H $V\lambda$ não rearranjado. Em uma modalidade, a substituição é com pelo menos 12, pelo menos 28, ou pelo menos 40 segmentos de gene $hV\lambda$ não rearranjados. Em uma modalidade, a substituição é com, pelo menos, sete segmentos de genes funcionais $hV\lambda$ não rearranjados, pelo menos, 16 segmentos de genes funcionais $hV\lambda$ não rearranjados, ou pelo menos 27 segmentos funcionais do gene $hV\lambda$ não rearranjados. Em uma modalidade, o camundongo comprehende uma substituição de todos os segmentos de gene de camundongo $J\lambda$ com pelo menos um segmento de gene $hJ\lambda$ não

rearranjados. Em uma modalidade, pelo menos um segmento de gene hJ λ não rearranjados é selecionado a partir de J λ 1, J λ 2, J λ 3, J λ 4, J λ 5, J λ 6, J2c7, e uma dos mesmos. Em uma modalidade específica, a um ou mais segmentos do gene hV λ é selecionado a partir de um 3 a 1, 4 a 3, 2 a 8, 3 a 9, 3 10, 2 a 11, 3 a 12, 2 a 14, 3 a 16, 2 a 18, 3 a 19, 3 a 21, 3 a 22, 2 a 23, 3 a 25, 3 a 27, 1 a 40, 7 a 43, 1 a 44, 5 a 45, 7 a 46, 1 a 47, 5 a 48, 9 a 49, 1 a 50, 1 a 51, 5 a 52 um segmento de gene hV λ , e uma combinação dos mesmos. Em uma modalidade específica, pelo menos um segmento de gene hJ λ não rearranjados é selecionado a partir de J λ 1, J λ 2, J λ 3, J λ 7, e uma combinação dos mesmos.

[00054] Em uma modalidade, o camundongo compreende uma substituição de segmentos de gene V λ de camundongo endógeno no local de camundongo endógeno λ com um ou mais segmentos de gene V λ humano endógeno no sítio λ de camundongo, em que os segmentos de genes hV λ estão ligados operativamente a um gene da região de camundongo C λ , de tal modo que o camundongo reorganiza os segmentos de genes hV λ e expressa uma cadeia leve de imunoglobulina quimérica reversa que compreende um domínio hV λ e um camundongo C λ . Em uma modalidade específica, o gene de camundongo C λ é C λ 2. Em uma modalidade específica, o gene de camundongo C λ é de pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, em pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 98% idêntica à do camundongo C λ 2. Em uma modalidade, 90 a 100% de segmentos de genes V λ de camundongo não rearranjados são substituídos com pelo menos um segmento de gene hV λ não rearranjado. Em uma modalidade específico, todos ou substancialmente todos os segmentos de gene V λ de camundongo endógeno são substituídos com pelo menos um segmento de gene hV λ não rearranjados. Em uma modalidade, a substituição é com pelo menos 12, pelo menos 28, ou pelo menos 40 segmentos de gene hV λ não

rearranjados. Em uma modalidade, a substituição é com pelo menos 7 segmentos do gene funcionais hV λ não rearranjados, pelo menos, 16 segmentos de genes funcionais hV λ não rearranjados, ou pelo menos 27 segmentos funcionais do gene hV λ não rearranjados. Em uma modalidade, o camundongo compreende uma substituição de todos os segmentos de gene de camundongo J λ com pelo menos um segmento de gene hJ λ não rearranjados. Em uma modalidade, o pelo menos um segmento de gene hJ λ não rearranjados é selecionado a partir de J λ 1, J λ 2, J λ 3, J λ 4, J λ 5, J λ 6, J λ 7, e uma combinação dos mesmos. Em uma modalidade específica, um ou mais segmentos do gene hV λ é selecionado a partir de um 3 a 1, 4 a 3, 2 a 8, 3 a 9, 3 a 10, 2 a 11, 3 a 12, 2 a 14, 3 a 16, 2 a 18, 3 a 19, 3 a 21, 3 a 22, 2 a 23, 3 a 25, 3 a 27, 1 a 40, 7 a 43, 1 a 44, 5 a 45, 7 a 46, 1 a 47, 5 a 48, 9 a 49, 1 a 50, 1 a 51, 5 a 52 um segmento de gene hV λ , e uma combinação dos mesmos. Em uma modalidade específica, pelo menos um segmento de gene hJ λ não rearranjados é selecionado a partir de J λ 1, J λ 2, J λ 3, J λ 7, e uma combinação dos mesmos.

[00055] Em um aspecto, um camundongo geneticamente modificado é fornecido, que compreende uma sequência da região intergênica humana V k a J k localizada em um sítio da cadeia leve k de camundongo endógeno.

[00056] Em uma modalidade, a sequência da região intergênica V k a J k humana está em um sítio de cadeia leve K de um camundongo endógeno que compreende um segmento de gene hV λ , e hJ λ e a sequência da região intergênica humana VKJ λ está disposta entre os segmentos de genes hV λ e hJ λ . Em uma modalidade específica, os segmentos de genes hV λ e hJ λ , são capazes de recombinar para formar um domínio variável de cadeia leve λ funcional humana no camundongo.

[00057] Em uma modalidade, é fornecido um camundongo que

compreende uma pluralidade de hVλ's e um ou mais hJλ's e a sequência da região intergênica humana Vκ a Jκ está disposta, em relação à transcrição, a jusante da proximal ou a maioria da sequência 3' hVλ e a montante ou 5' da primeira sequência hJλ.

[00058] Em uma modalidade, a região intergênica humana Vκ a Jκ é uma região localizada cerca de 130 bp a jusante ou 3' de um segmento do gene humano Vκ4 a 1, cerca de 130 bp a jusante da extremidade 3' não traduzida do segmento de gene Vκ4 a 1 humano, e se estende até cerca de 600 bp a montante ou 5' de um segmento de gene humano Jλ 1. Em uma modalidade específica, a região intergênica Vκ a Jκ humana é de cerca de 22,8 kb de tamanho. Em uma modalidade, a região intergênica Vκ a Jκ é de cerca de 90 % ou mais, 91 % ou mais, 92% ou mais, 93% ou mais, 94% ou mais, ou cerca de 95 % ou mais idênticos com uma região intergênica Vκ a Jλ humana que se estende desde o final da extremidade não traduzida 3' de um segmento de gene Vκ 4 a 1 humano a cerca de 600 por a montante de um segmento de gene Jλ1 humano. Em uma modalidade, a região intergênica Vκ a Jκ comprehende a SEQ ID NO: 100. Em uma modalidade específica, a região intergênica Vκ a Jκ comprehende um fragmento funcional da SEQ ID NO: 100. Em uma modalidade específica, a região intergênica Vκ a Jλ é SEQ ID NO: 100.

[00059] Em um aspecto, um camundongo, um camundongo de células (por exemplo, um camundongo em células estaminais embrionárias), um embrião de camundongo, e um tecido de camundongo são fornecidos que comprehendem a citada sequência da região intergênica humana Vκ a Jκ, em que a sequência região intergênica é etópica. Em uma modalidade específica, a sequência etópica é colocada em um local da imunoglobulina de camundongo endógeno humanizada.

[00060] Em um aspecto, um constructo de ácido nucleico isolado que

está previsto que compreende o recitado humana VK a J_k sequência região intergênica λ. Em uma modalidade, o constructo de ácido nucleico compreende os braços alvo para alvejar a sequência da região intergênica humana VK a J_k de um sítio de cadeia leve de camundongo. Em uma modalidade específica, o sítio da cadeia leve de camundongo é um sítio K. Em uma modalidade específica, a segmentação dos braços alvo como a região intergênica humana VK a J_k de um sítio K de camundongo endógeno modificado, em que a focalização é uma posição entre uma sequência de hVλ, e uma sequência de hJλ

[00061] Em um aspecto, um camundongo geneticamente modificado é proporcionado, em que o camundongo compreende não mais de dois alelos de cadeia leve, em que os alelos de cadeia leve compreendem (a) uma imunoglobulina Vλ humana não rearranjada, e um segmento de gene Jλ, a um sítio da cadeia leve de camundongo endógeno que compreende um gene C_L de Camundongo, e, (b) uma imunoglobulina não rearranjada V_L e um segmento do gene J_L de sítio de cadeia leve de camundongo endógeno que compreende um gene C_L de Camundongo.

[00062] Em uma modalidade, o sítio da cadeia leve de camundongo endógeno é um sítio K. Em uma outra modalidade, o sítio da cadeia leve de camundongo endógeno é um sítio λ.

[00063] Em uma modalidade, os não mais de dois alelos de cadeia leve são selecionados a partir de um alelo K e um alelo λ, dois alelos K, e dois alelos λ. Em uma modalidade específica, um dos dois alelos de cadeia leve é um alelo λ que compreende um gene Cλ2.

[00064] Em uma modalidade, o composto de um local funcional de imunoglobulina da cadeia leve de camundongo e um local não funcional da cadeia leve onde o sítio da cadeia leve funcional compreende uma imunoglobulina humana não rearranjada Vλ e um segmento do gene Jλ em um sítio da cadeia leve K de camundongo endógena que

compreende um gene de camundongo CK.

[00065] Em uma modalidade, o camundongo comprehende um local funcional da cadeia leve de imunoglobulina e um local não funcional de cadeia leve, em que o local funcional da cadeia leve comprehende uma imunoglobulina $V\kappa$ humana não rearranjada e um segmento de gene em um sítio da cadeia leve $J\lambda$ do camundongo endógeno que comprehende um gene do camundongo $C\lambda$. Em uma modalidade, o gene $C\lambda$ é $C\lambda 2$. Em uma modalidade específica, o gene de Camundongo $C\kappa$ é de pelo menos 60 %, pelo menos 70 %, pelo menos 80 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, ou pelo menos 98 % idêntica à do camundongo $C\lambda 2$.

[00066] Em uma modalidade, o camundongo comprehende ainda pelo menos um alelo imunoglobulina cadeia pesada. Em uma modalidade, o pelo menos um alelo de imunoglobulina de cadeia pesada comprehende um segmento de gene $V\lambda$ humano, um segmento de gene humano DH, e um segmento de gene humano endógeno em uma local $J\lambda$ de cadeia pesada de camundongo que comprehende um gene de cadeia pesada humana que expressa uma cadeia pesada humano/camundongo. Em uma modalidade específica, o camundongo é composto por dois alelos de imunoglobulina de cadeia pesada, e o camundongo expressa uma cadeia pesada humana/ camundongo.

[00067] Em uma modalidade, o camundongo comprehende um primeiro alelo de cadeia leve que comprehende um $hV\lambda$ não rearranjado e um $hJ\lambda$ não rearranjado, a um sítio K de camundongo endógeno que comprehende um gene endógeno CK, e um segundo alelo de cadeia leve que comprehende um $hV\lambda$ não rearranjado e um $hJ\lambda$ não rearranjado, a um local camundongo endógeno K que comprehende um gene endógeno CK. Em uma modalidade específica, os primeiro e segundo alelos de cadeia leve são os únicos alelos funcionais de cadeia leve do camundongo geneticamente modificado. Em uma modalidade específica, o camundongo comprehende um local não funcional. Em uma

modalidade, o camundongo geneticamente modificado não expressa uma cadeia leve que compreende uma região constante λ .

[00068] Em uma modalidade, o camundongo compreende um primeiro alelo cadeia leve que compreende um hV_k não rearranjado e um hJ_k não rearranjado, a um sítio K de camundongo endógeno que compreende um gene endógeno C_k , e um segundo alelo de cadeia leve que compreende um hV_λ não rearranjado e um hJ_λ não rearranjado, a um local camundongo endógeno λ que compreende um gene endógeno C_λ . Em uma modalidade específica, os primeiro e segundo alelos de cadeia leve são os únicos alelos funcionais de cadeia leve do camundongo geneticamente modificado. Em uma modalidade, o gene C_λ endógeno é $C_\lambda 2$. Em uma modalidade específica, o gene de camundongo C_λ é de pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 98% idêntica à do camundongo $C_\lambda 2$.

[00069] Em uma modalidade, o camundongo é composto por seis alelos de imunoglobulina, em que o primeiro alelo compreende um segmento de gene de imunoglobulina V_λ e J_λ não rearranjado em um sítio K de camundongo endógeno da cadeia leve que compreende um gene do camundongo C_k , o segundo compreende um Segmento de gene V_k e J_k de imunoglobulina não rearranjado em um sítio K de camundongo endógeno da cadeia leve que compreende um gene do camundongo C_k , o terceiro compreende um segmento de gene V_λ e J_λ de imunoglobulina não rearranjado endógeno em um sítio λ da cadeia leve de camundongo que compreende um gene de camundongo C_λ , a cada quarto e quinto independentemente compreende um segmento de gene V_H e D_H e J_H não rearranjado em sítio de cadeia pesada de camundongo endógeno que compreende um gene da cadeia pesada do camundongo, e o sexto compreende (a) um segmento de gene V_λ e J_λ não rearranjado de imunoglobulina de um camundongo endógeno com

um sítio λ de cadeia leve que comprehende um gene de camundongo C λ , (b) um sítio λ que é não funcional, ou (c) uma deleção no todo ou em parte do sítio λ .

[00070] Em uma modalidade, o primeiro alelo comprehende um hV λ e hJ λ não rearranjado. Em uma modalidade, o segundo alelo comprehende um hV λ e hJ λ não rearranjados. Em uma modalidade, o terceiro comprehende um alelo hV λ e hJ λ não rearranjado. Em uma modalidade, a cada quarto e quinto independentemente comprehende um hV H e hD H e hJ H não rearranjados. Em uma modalidade, o sexto alelo comprehende um sítio λ do camundongo endógeno que é eliminado no todo ou em parte.

[00071] Em uma modalidade, o camundongo é composto por seis alelos de imunoglobulina, em que o primeiro alelo comprehende segmento de gene V λ e J λ de imunoglobulina não rearranjado em sítio λ de cadeia leve de camundongo endógeno que comprehende um gene do camundongo C λ , o segundo comprehende segmento de gene V λ e J λ de imunoglobulina não rearranjado em um sítio λ de cadeia leve de camundongo endógeno que comprehende um gene do camundongo C k , o terceiro comprehende segmento de gene V λ e J λ de imunoglobulina não rearranjado de um sítio K de cadeia leve de camundongo endógeno que comprehende um gene de camundongo C K , a cada quarto e quinto independentemente comprehende um segmento de gene V λ e D H e J λ não rearranjado em um sítio da cadeia pesada de camundongo endógeno que comprehende um gene da cadeia pesada do camundongo, e o sexto comprehende (a) um segmento do gene V K e J λ da imunoglobulina não rearranjado em um sítio K de cadeia leve de camundongo endógeno que comprehende um gene de camundongo C K , (b) um sítio K que é não funcional, ou (c) uma deleção de um ou mais elementos do sítio K.

[00072] Em uma modalidade, o primeiro alelo comprehende um

segmento de gene hV λ e hJ λ não rearranjado. Em uma modalidade, o segundo alelo compreende um segmento de gene hV λ e hJ λ não rearranjados. Em uma modalidade, o terceiro alelo compreende um segmento de gene hV κ e hJ λ não rearranjado. Em uma modalidade, a cada quarto e quinto independentemente compreende um segmento de gene hV_H e hD_H e hJ_H não rearranjados. Em uma modalidade, o sexto alelo compreende um sítio K do camundongo endógeno que está funcionalmente silenciado.

[00073] Em uma modalidade, o camundongo geneticamente modificado compreende uma célula B que compreende um gene de anticorpo compreendendo um domínio hV λ rearranjado funcionalmente ligado a um domínio de Camundongo CL. Em uma modalidade, o domínio de Camundongo C_L é selecionado a partir de um camundongo CK e um domínio de camundongo C λ . Em uma modalidade específica, o domínio de camundongo C λ é derivado de um gene C λ 2. Em uma modalidade específica, o camundongo domínio C λ é derivado um domínio C λ , que é pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 98% à do camundongo idêntico C λ 2.

[00074] Em um aspecto, um camundongo geneticamente modificado desde que expressa V λ em uma região C_L que é um CK. Em um aspecto, é proporcionado um camundongo geneticamente modificado que expressa uma região hV λ em um CL selecionado a partir de um CK humano, um C λ humano, ou um camundongo CK. Em um aspecto, é proporcionado um camundongo geneticamente modificado que expressa uma região hV λ em um camundongo Ck.

[00075] Em uma modalidade, cerca de 10 a 50 % dos esplenócitos do camundongo são células B (isto é, CD19 positiva), ou que cerca de 9 a 28 % expressam uma cadeia leve de imunoglobulina compreendendo domínio hV λ fundido a um domínio de camundongo Ck.

[00076] Em uma modalidade específica, cerca de 23 a 34 % dos esplenócitos do camundongo são células B (isto é, CD19 positiva), ou que cerca de 9 a 11 % de expressar uma cadeia leve de imunoglobulina que compreende um domínio hV λ fundido a um domínio de Camundongo Ck.

[00077] Em uma modalidade específica, cerca de 19 a 31 % dos esplenócitos do camundongo são células B (isto é, CD19 positiva), ou que cerca de 9 a 17 % de expressar uma cadeia leve de imunoglobulina compreendendo um domínio hV λ fundido a um domínio de Camundongo Ck.

[00078] Em uma modalidade específica, cerca de 21 a 38 % dos esplenócitos do camundongo são Células B (isto é, CD19 positiva), ou que cerca de 24 a 27 % de expressar uma cadeia leve de imunoglobulina que compreende um domínio hV λ fundido a um domínio de Camundongo Ck.

[00079] Em uma modalidade específica, cerca de 10 a 14 % dos esplenócitos do camundongo são Células B (isto é, CD19 positiva), ou que cerca de 9 a 13 % de expressar uma cadeia leve de imunoglobulina que compreende um domínio hV λ fundido a um domínio de Camundongo Ck.

[00080] Em uma modalidade específica, cerca de 31 a 48% dos esplenócitos do camundongo são Células B (isto é, CD19 positiva), ou que cerca de 15 a 21% de expressar uma cadeia leve de imunoglobulina que compreende um hV λ domínio fundido a um domínio de Camundongo Ck. Em uma modalidade específica, a cerca de 30 a 38% dos esplenócitos do camundongo são células B (isto é, CD19 positiva), dos quais cerca de 33 a 48 % exprimem uma cadeia leve de imunoglobulina que compreende um domínio hV λ fundido a um domínio de Camundongo Ck.

[00081] Em uma modalidade, cerca de 52 a 70 % da medula óssea

do camundongo são células B (CD19 positiva), ou que cerca de 31 a 47 % das células B imaturas (isto é, CD19 positiva/B220 intermediário positivo/IgM positivo) de expressar uma cadeia leve de imunoglobulina que compreende um domínio hV λ fundido a um domínio de Camundongo Ck.

[00082] Em uma modalidade, cerca de 60% da medula óssea do camundongo são células B (Isto é, CD19 positiva), ou que cerca de 38,3% das células B imaturas (isto é, CD19 positiva/B220 intermediário positivo/IgM positivo) expressam uma cadeia leve de imunoglobulina que compreende um domínio hV λ fundido a um domínio de Camundongo Ck. Em uma modalidade, o camundongo expressa um anticorpo que compreende uma cadeia leve que compreende um domínio Variável derivado de um segmento de gene V humano e J humano, e um domínio constante derivado de um gene da região constante de camundongo. Em uma modalidade, o gene da região constante de camundongo é um gene CK. Em uma outra modalidade, o gene da região constante de camundongo é um gene C λ . Em uma modalidade específica, a região C λ é C λ 2. Em uma modalidade específica, o gene de camundongo C λ é derivado de um gene Ck que é pelo menos 60 %, pelo menos 70 %, pelo menos 80 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95%, ou pelo menos 98 % idêntico ao camundongo C λ 2. Em uma modalidade específica, o anticorpo compreende ainda uma cadeia pesada que compreende um domínio Variável derivado de um segmento de gene V humano, um D humana e um J humano, e um domínio constante de cadeia pesada derivada de um gene da região constante da cadeia pesada do camundongo. Em uma modalidade, o gene da cadeia pesada de camundongo da região constante compreende uma dobradiça da sequência CH2 a CH3 de um domínio constante de cadeia pesada. Em uma outra modalidade, o gene da cadeia pesada de camundongo da região constante compreende a

dobraída da sequência CH1 a CH2 a CH3 de um domínio constante de cadeia pesada. Em uma outra modalidade, a cadeia pesada de camundongo gene da região constante compreende uma sequência de CH1 a CH2 a CH3 a CH4 de um domínio constante de cadeia pesada. Em uma outra modalidade, a cadeia pesada de camundongo gene da região constante compreende um CH2 a CH3 a CH4 sequência de um domínio constante de cadeia pesada.

[00083] Em uma modalidade, o camundongo expressa um anticorpo que compreende uma cadeia leve que compreende uma sequência humana reorganizada V λ a J λ , e uma sequência de camundongo CK. Em uma modalidade, a sequência V λ a J λ humana rearranjada é derivada de um rearranjo dos segmentos de genes selecionados de um hV λ 3 a 1, 4 a 3, 2 a 8, 3 a 9, 3 a 10, 2 a 14, 3 a 19, 2 a 23, 3 a 25, 1 a 40, 7 a 43, 1 a 44, 5 a 45, 7 a 46, 1 a 47, 9 a 49, e um segmento de gene 1 a 51. Em uma modalidade, a sequência V λ a J λ humana rearranjada, é derivada de segmentos de genes hJ λ rearranjados, selecionados de entre segmento de gene J λ L, J λ 2, J λ S, e J λ 7.

[00084] Em uma modalidade, o camundongo expressa um anticorpo que compreende uma cadeia leve que compreende uma região variável da cadeia leve λ da imunoglobulina rearranjada que compreende uma sequência humano V λ /J λ , selecionada a partir de 3 a 1/1, 3 a 1/7, 4 a 3/1, 4 a 3/7, 2 a 8 / 1, 3 a 9/1, 3 a 10/1, 3 10/3, 3 a 10/7, 2 a 14/1, 3 a 19/1, 2 a 23/1, 3 a 25/1, 1 a 40/1, 1 a 40/2, 1 a 40 / 3, 1 a 40/7, 7 a 43/1, 7 a 43/3, 1 a 44/1, 1 a 44/7, 5 a 45/1, 5 a 45/2, 5 a 45/7, 7 a 46/1, 7 a 46/2, 7 a 46/7, 9 a 49/1, 9 a 49/2, 9 a 49/7 e 1 a 51/1. Em uma modalidade específica, a célula B expressa um anticorpo que compreende um domínio Variável da imunoglobulina humana de cadeia pesada fundida com um domínio de cadeia pesada de camundongo constante, e um domínio Variável de cadeia leve k de imunoglobulina humana fundido com um domínio de cadeia leve K constante de

camundongo.

[00085] Em um aspecto, é fornecido um camundongo que expressa um anticorpo que compreende (a) um cadeia pesada que compreende um domínio Variável de cadeia pesada derivada de um segmento gene da região da cadeia pesada humana não rearranjado, em que o domínio Variável de cadeia pesada é fundido a uma região de cadeia pesada de camundongo (CH) constante, e (b) uma cadeia leve que compreende um domínio Variável de cadeia leve derivada de um hVλ e um hJλ não rearranjado, em que o domínio Variável da cadeia leve está fundido com uma região Camundongo CL .

[00086] Em uma modalidade, o camundongo compreende (i) um sítio de cadeia pesada que compreende uma substituição de todo ou substancialmente todos os segmentos de genes funcionais de camundongo endógeno V, D e J com todos ou substancialmente todos os segmentos de genes funcional humano V, D, J e, um gene de camundongo CH, (ii) um primeiro sítio K de cadeia leve compreendendo uma substituição de todo ou substancialmente todos os segmentos do gene funcional VK e Jλ de camundongo endógeno, substancialmente toda, ou uma pluralidade de segmentos de genes hVλ e hJλ funcional, e um camundongo do gene CK, (iii) um segundo sítio K de cadeia leve que compreende uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos do gene VK e Jk funcional de camundongo endógeno com, substancialmente toda, ou uma pluralidade de segmentos de genes, hV_k e hJ_k funcional de camundongo do gene CK. Em uma modalidade, o camundongo não expressa um anticorpo que compreende uma região Cλ. Em uma modalidade, o camundongo compreende uma deleção de um segmento de gene Cλ e/ou Vλ e/ou um gene Jλ. Em uma modalidade, o camundongo não funcional compreende um sítio de cadeia leve λ. Em uma modalidade específica, o sítio da cadeia leve λ é suprimido, no todo ou em parte.

[00087] Em uma modalidade, o camundongo comprehende (i) um sítio de cadeia pesada que comprehende uma substituição de todo ou substancialmente todos os segmentos de gene funcionais de camundongo endógeno V, D e J com todos ou substancialmente todos os segmentos de gene funcionais V, D e J, um gene de camundongo CH, (ii) um primeiro sítio K de cadeia leve comprehendendo uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos de gene funcionais V, D e J com todos, substancialmente todos, ou uma pluralidade de segmentos de genes hV λ e hJ λ funcionais e um gene do camundongo C λ , (iii) um segundo sítio K de cadeia leve que comprehende uma substituição de todos ou substancialmente todos os segmentos de genes de camundongo endógeno funcional V λ e J λ com toda, substancialmente toda, ou uma pluralidade de segmentos de genes hV λ e hJ λ funcional, e um gene de camundongo C λ . Em uma modalidade específica, o gene de camundongo C λ é C λ 2. Em uma modalidade específica, o gene de camundongo C λ é derivado de um gene C λ que é pelo menos 60 %, pelo menos 70 %, pelo menos 80 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, ou pelo menos 98 % idêntica à do camundongo C λ 2.

[00088] Em uma modalidade, o camundongo comprehende uma deleção de um segmento de gene CK e/ou um gene VK e/ou um gene J λ . Em uma modalidade, o camundongo não funcional comprehende um sítio de cadeia leve K.

[00089] Em um aspecto, um camundongo geneticamente modificado que expressa um anticorpo é fornecido, em que mais de 10 %, superior a 15 %, superior a 20 %, superior a 25 %, superior a 30 %, superior a 35 %, superior a 40 %, superior a 60 %, superior a 70 %, maior do que 80 %, ou maior do que 90 % de anticorpo IgG total produzido pelo camundongo comprehende um derivado de domínio Variável k, e em que o camundongo expressa os anticorpos que comprehendem um domínio

Variável K derivado fundido com uma região Camundongo Ck. Nas modalidades específicas, cerca de 15 a 40 %, 20 a 40 %, 25 a 40 %, 30 a 40 % ou 35 a 40 % do total de anticorpos produzidos pelo camundongo compreende um derivado de domínio Variável k.

[00090] Em uma modalidade, o domínio Variável de um derivado λ é derivado de um hV λ e um hJ λ . Em uma modalidade, o domínio Variável de um derivado k é uma cadeia leve que compreende uma região de camundongo CK. Em uma modalidade específica, a região Variável de um derivado k é uma cadeia leve que compreende uma região de camundongo CA. Em uma outra modalidade específica, a região é uma região Ck C λ 2. Em uma modalidade, o domínio Variável do derivado K é derivado de hV λ e hJ λ , e em uma modalidade específica é uma cadeia leve que compreende uma região de camundongo CK.

[00091] Em um aspecto, um constructo de DNA isolado é fornecido que compreende um braço de homologia a montante e um braço de homologia a jusante, em que a montante e a jusante de homologia de braços segmentam um constructo de um camundongo Sítio K, e o constructo compreende um segmento não rearranjados hV λ funcional e um segmento de hJ λ funcional não rearranjado, e uma seleção ou a sequência do marcador.

[00092] Em um aspecto, um constructo de DNA isolado é fornecido, que compreende, de 5' para 3' com respeito à direção da transcrição, um braço de direcionamento para uma sequência de direcionamento a montante do camundongo V λ 2, um cassete de seleção flanqueado em 5' e 3' com sítios de reconhecimento de recombinase, e um braço de segmentação para segmentar uma sequência de camundongo λ 3' do camundongo J λ 2. Em uma modalidade, o cassete de seleção é um cassete Frt' ed Hyg- TK. Em uma modalidade, a extremidade 3' do braço de segmentação compreende camundongo C λ 2, J λ 4, C λ 4, e camundongo realçador 2.4.

[00093] Em um aspecto, um constructo de DNA isolado é fornecido, que comprehende, de 5' para 3' com respeito à direção da transcrição, um braço de direcionamento para o local do camundongo alvo λ 5' em relação a V λ 1, um cassete de seleção flanqueado em 5' e 3' com sítios de reconhecimento de recombinase, e em 3' braço de segmentação 3' para segmentar uma sequência de camundongo λ 3' em relação ao camundongo CK1. Em uma modalidade, o cassete de seleção é um cassete de neomicina loxed. Em uma modalidade, a extremidade 3' do braço de segmentação comprehende o realçador λ 3' de camundongo e realçador λ 3'de camundongo 3.1.

[00094] Em um aspecto, um constructo de DNA isolado é fornecido, que comprehende de 5' para 3' com respeito à direção da transcrição, um braço de direcionamento para o sítio alvo do camundongo λ de 5' em relação a V λ 2, um cassete de seleção flanqueado em 5' e 3' com sítios de reconhecimento de recombinase e 3' do braço de segmentação para segmentar uma sequência de camundongo λ 3' em relação ao camundongo J λ 2 e 5' em relação ao camundongo C λ 2. Em uma modalidade, o cassete de seleção é um cassete higromicina Frt' ed -TK. Em uma modalidade, a extremidade 3' do braço de segmentação comprehende os segmentos de gene do camundongo C λ 2 a J λ 4 a C λ 4 e camundongo λ realçador 2.4.

[00095] Em um aspecto, um constructo de DNA isolado é fornecido, que comprehende, de 5' para 3' com respeito à direção da transcrição, um braço de direcionamento para o sítio alvo do camundongo λ 5' em relação a V λ 2, um cassete de seleção flanqueado em 5' e 3' com sítios de reconhecimento de recombinase, um fragmento do genoma humano, comprehendendo uma região contígua do λ humano, sítio de cadeia leve de hV λ 3 a 12 a jusante para a extremidade de hJ λ , 1, e 3' do braço alvo para alvejar uma sequência de camundongo λ 3' em relação ao camundongo J λ 2. Em uma modalidade, o cassete de seleção é um

cassete de neomicina F^rt' ed. Em uma modalidade, a extremidade 3' do braço de segmentação compreende o camundongo de segmentos de genes Cλ2 a Jλ 4 a Cλ 4 e camundongo λ 2.4 realçador.

[00096] Em um aspecto, um constructo de DNA isolado é fornecido, que compreende uma região do sítio da cadeia humana leve contígua λ de hVλ.3 a 12 a jusante para a extremidade de hJλ 1.

[00097] Em um aspecto, um constructo de DNA isolado é fornecido, que compreende, de 5' para 3' com respeito à direção da transcrição, um braço de direcionamento para o sítio alvo do camundongo λ 5' em relação a V λ 2, um cassete de seleção flanqueado em 5' e 3' com sítios de reconhecimento de recombinase e um fragmento do gene humano que compreende uma região sítio de cadeia leve contígua humana λ de hVλ 3 a 27 a jusante para a extremidade de hVλ 2 a 8. Em uma modalidade, o cassete de seleção é um cassete de higromicina F^rt' ed. Em uma modalidade, o fragmento do gene humano compreende um braço 3' alvo. Em uma modalidade específica, a extremidade 3' do braço de segmentação é constituída por cerca de 53 kb do sítio da cadeia leve humana a partir de λ hVλ3 a 12 a jusante para a extremidade de hVλ 2 a 8.

[00098] Em um aspecto, um constructo de DNA isolado é fornecido, que compreende uma região do sítio da cadeia leve humana contígua a partir de λ hVλ.3 a 27 a jusante para a extremidade de hVλ3 a 12.

[00099] Em um aspecto, um constructo de DNA isolado é fornecido, que compreende, de 5' para 3' com respeito à direção da transcrição, um braço de direcionamento para o sítio alvo do camundongo λ 5' em relação a V λ 2, um cassete de seleção flanqueado em 5' e 3' com sítios de reconhecimento de recombinase, um fragmento do gene compreendendo um primeiro local da região humano de cadeia leve contígua humana λ de hVλ 5 a 52 a jusante para a extremidade de hVλ1 a 40, um local de enzima de restrição, e um segundo fragmento do gene

humano, compreendendo uma local da região da cadeia humana leve contígua λ de hVλ 3 a 29 a jusante para a extremidade de hVλ 82K. Em uma modalidade, o cassete de seleção é um cassete de neomicina Frt' ed. Em uma modalidade, o sítio de enzima de restrição é um local para uma endonuclease homing. Em uma modalidade específica, a endonuclease homing é PI a SCEL. Dentro da modalidade, o segundo fragmento do gene humano é um braço 3' alvo. Em uma modalidade específica, a extremidade 3' do braço de segmentação é constituída por cerca de 27 kb do sítio da cadeia humana leve λ de hVλ 3 a 29 a jusante para a extremidade de hVλ82K.

[000100] Em um aspecto, um constructo de DNA isolado é fornecido, que compreende um local da região da cadeia humana leve contígua λ de hVλ 5 a 52 a jusante para a extremidade de hVλ 1 a 40.

[000101] Em um aspecto, um constructo de DNA isolado é fornecido, que compreende, de 5' para 3' com respeito à direção da transcrição, um braço de direcionamento para o alvo do camundongo Sítio K de 5' em relação aos segmentos de VK de genes endógenos, dois sítios de reconhecimento de recombinase justapostas, um cassete de seleção 3' para os sítios de reconhecimento de recombinase justapostas, e uma 3' visando o braço para alvejar um camundongo K sequência 5' com respeito à luz da cadeia K segmentos de gene Variáveis. Em uma modalidade, o sítio de reconhecimento de recombinase justapostas estão em orientação oposta em relação uma à outra. Em uma modalidade específica, os sítios de reconhecimento de recombinase são diferentes. Em uma outra modalidade específica, o sítio de reconhecimento recombinase são um sítio loxP e um sítio lox 511. Em uma modalidade, o cassete de seleção é um cassete de neomicina.

[000102] Em um aspecto, um constructo de DNA isolado é fornecido, que compreende, de 5' para 3' com respeito à direção da transcrição, um braço de direcionamento para o sítio K alvo do camundongo de 5' em

relação aos segmentos de gene de camundongo Jλ, um cassete de seleção, um sítio de reconhecimento de recombinase a 3' do cassete de seleção, e um 3' alvo para o braço alvo uma sequência K do camundongo 3' em relação aos segmentos de gene de camundongo Jλ e 5' para um K do camundongo intrônico potenciador. Em uma modalidade, cassete de seleção é um cassete de higromicina a TK. Em uma modalidade, o sítio de reconhecimento da recombinase é na mesma direção em relação à transcrição como cassete de seleção. Em uma modalidade específica, o sítio de reconhecimento da recombinase é um local *loxP*.

[000103] Em um aspecto, um constructo de DNA isolado é fornecido, que compreende, de 5' para 3' em relação à direção de transcrição, uma primeira sequência de camundongo fragmento do gene compreendendo 5' dos segmentos de VK de camundongo endógenas do gene, um sítio de reconhecimento da recombinase primeiro, um sítio de reconhecimento da recombinase segundo, e um fragmento do gene de camundongo segundo compreendendo a sequência 3' do camundongo endógeno Jλ de segmentos de gene e 5' do K camundongo intrônico realçador.

[000104] Em um aspecto, um camundongo geneticamente modificado é proporcionado, em que a modificação genética compreende uma modificação de um ou mais dos constructos de DNA descritos acima ou na presente invenção.

[000105] Em um aspecto, a utilização de um constructo de DNA isolado a fazer um camundongo, tal como descrito na presente invenção é proporcionado. Em um aspecto, a utilização de um constructo de DNA isolado como descrito no presente documento com um método para a produção de uma proteína de ligação ao antígeno é fornecido.

[000106] Em um aspecto, uma célula estaminal não humana é fornecida que compreende uma segmentação do vetor que compreende

um constructo de DNA como descrito acima e na presente invenção. Em um aspecto, as células estaminais não humanas é fornecido, em que a célula estaminal não humana é derivada de um camundongo descrito na presente invenção.

[000107] Em uma modalidade, a célula estaminal não humana é uma com células estaminais embrionárias (ES). Em uma modalidade específica, a célula ES é uma célula ES do camundongo.

[000108] Em um aspecto, a utilização de uma célula estaminal não humana, tal como descrito na presente invenção para fazer um camundongo, tal como descrito na presente invenção é proporcionada. Em um aspecto, a utilização de uma célula estaminal não humana, tal como descrito na presente invenção para fazer uma proteína de ligação ao antígeno é fornecida.

[000109] Em um aspecto, um embrião de camundongo é fornecido, em que o embrião de camundongo compreende uma modificação genética como proporcionada na presente invenção. Em uma modalidade, um embrião de camundongo hospedeiro que compreende uma célula ES doadora é fornecido, em que a célula ES doadora compreende uma modificação genética como descrito na presente invenção. Em uma modalidade, o embrião é um embrião de camundongo fase pré-mórula. Em uma modalidade específica, o estágio de embrião pré-mórula é um embrião em estágio de 4 células, ou um estágio de embrião de 8 células. Em uma outra modalidade específica, o embrião de camundongo é um blastocisto.

[000110] Em um aspecto, a utilização de um embrião de camundongo tal como descrito na presente invenção para fazer um camundongo, tal como descrito na presente invenção é proporcionada. Em um aspecto, a utilização de um embrião de camundongo tal como descrito na presente invenção para fazer uma proteína de ligação ao antígeno é fornecida.

[000111] Em um aspecto, a célula não a humano é fornecida, em que a célula não humana comprehende uma sequência do gene de cadeia leve de imunoglobulina rearranjada derivada de camundongo geneticamente modificado tal como descrito na presente invenção. Em uma modalidade, a célula é uma célula B. Em uma modalidade, a célula é um hibridoma. Em uma modalidade, a célula codifica um domínio Variável de cadeia leve da imunoglobulina e/ou um domínio Variável da cadeia pesada de imunoglobulina que é somaticamente mutado.

[000112] Em um aspecto, a célula não a humano é fornecida, em que a célula não humana comprehende uma sequência do gene de cadeia leve de imunoglobulina rearranjada derivada de camundongo geneticamente modificado tal como descrito na presente invenção. Em uma modalidade, a célula é uma célula B. Em uma modalidade, a célula é um hibridoma. Em uma modalidade, a célula codifica um domínio Variável de cadeia leve da imunoglobulina e/ou um domínio Variável da cadeia pesada de imunoglobulina que é somaticamente mutado.

[000113] Em um aspecto, a utilização de uma célula não humana, tal como descrito na presente invenção para fazer um camundongo, tal como descrito na presente invenção é proporcionada. Em um aspecto, a utilização de uma célula não humana, tal como descrito na presente invenção para fazer uma proteína de ligação ao antígeno é fornecida.

[000114] Em um aspecto, uma célula B de camundongo está prevista que exprima uma imunoglobulina de cadeia leve que comprehende (a) uma região Variável derivada de um segmento de gene hV λ . e um segmento de gene h λ , e, (b) um gene de Camundongo CL. Em uma modalidade, o gene de Camundongo CL é selecionado a partir de um gene CK e um C λ . Em uma modalidade específica, o gene C λ é C λ 2. Em uma modalidade específica, o gene de Camundongo Ck é derivado de um gene Ck que é pelo menos 60 %, pelo menos 70 %, pelo menos 80 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, ou pelo menos 98 % idêntica

à do camundongo Cλ2. Em uma modalidade, a célula B de camundongo expressa ainda uma cadeia pesada que compreende (c) uma região Variável derivada de um hVλ, um HDH, e (d) um segmento hJλ. Em uma modalidade, a célula B não inclui um gene λ rearranjado. Em uma outra modalidade, a célula B não inclui um gene K rearranjado.

[000115] Em um aspecto, um método para a produção de um anticorpo de um camundongo geneticamente modificado é fornecido, que compreende: (a) a exposição de um camundongo geneticamente modificado a um antígeno, em que o camundongo tem um genoma compreendendo pelo menos um hVλ e pelo menos um hJλ a um sítio da cadeia leve endógena, em que o sítio da cadeia leve compreende um gene de Camundongo endógeno CL, (b) permitir que o camundongo geneticamente modificado desenvolva uma resposta imunitária contra o antígeno, e (c) isolar o camundongo de (b) de um anticorpo que reconhece especificamente o antígeno, ou isolando a partir do camundongo de (b) uma célula que compreende um domínio de imunoglobulina que reconhece especificamente o antígeno, em que o anticorpo compreende uma cadeia leve derivada de um hVλ, um hJλ e um gene de Camundongo CL. Em uma modalidade específica, o camundongo do gene CL é um camundongo do gene CK.

[000116] Em uma modalidade, um método para a produção de um anticorpo de um organismo de camundongo geneticamente modificado é fornecido, que compreende: (a) a exposição de um camundongo geneticamente modificado a um antígeno, em que o camundongo tem um genoma compreendendo pelo menos um hVλ em um local endógeno K e pelo menos um Jλ no sítio K, em que o sítio K compreende um gene do camundongo Ck, (b) permitir que o camundongo geneticamente modificado possa desenvolver uma resposta imunitária ao antígeno; e, (c) isolar o camundongo de (b) de um anticorpo que reconhece especificamente o antígeno, ou isolando a

partir do camundongo de (b) uma célula que compreende um domínio de imunoglobulina que reconhece especificamente o antígeno, em que o anticorpo compreende uma cadeia leve derivada a partir de um hV λ , um hJ λ e um camundongo do gene CK.

[000117] Em uma modalidade, o gene K constante de cadeia leve é selecionado a partir de um gene humano CK e um gene de camundongo CK.

[000118] Em uma modalidade, um método para a produção de um anticorpo de um organismo de camundongo geneticamente modificado é fornecido, que compreende: (a) a exposição de um camundongo geneticamente modificado a um antígeno, em que o camundongo tem um genoma compreendendo pelo menos um hV λ no sítio da cadeia leve λ e pelo menos um J λ no sítio de cadeia leve λ , em que o local da cadeia leve λ compreende um gene de camundongo C λ , (b) permitir que o camundongo geneticamente modificado possa desenvolver uma resposta imunitária ao antígeno, e (c) isolar o camundongo de (b) um anticorpo que reconhece especificamente o antígeno, ou isolar a partir do camundongo (b) de uma célula que compreende um domínio de imunoglobulina que reconhece especificamente o antígeno, ou a identificação do camundongo (b) de uma sequência de ácido nucleico que codifica um domínio Variável de cadeia pesada e/ou leve que se liga ao antígeno, em que o anticorpo compreende uma cadeia leve derivada de um hV λ , um hJ λ e um gene de camundongo C λ

[000119] Em uma modalidade, o gene λ constante de cadeia leve é selecionado a partir de um gene C λ humano e um gene de camundongo C λ . Em uma modalidade, o gene de cadeia leve λ é um gene C λ constante humano. Em uma modalidade específica, o gene C λ humano é selecionado a partir de C λ 1, C λ 2, C λ 3 e C λ 7. Em uma modalidade, o gene λ constante da cadeia leve é um gene de camundongo C λ . Em uma modalidade específica, o gene de camundongo C λ é selecionado

a partir Cλ1, Cλ2 e Cλ3. Em uma modalidade mais específica, o gene de camundongo Cλ é Cλ2. Em uma outra modalidade específica, o gene de camundongo Cλ é derivado de um gene Cλ λ, que é pelo menos 60 %, pelo menos 70 %, pelo menos 80 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, ou pelo menos 98 % idêntico ao camundongo Cλ2.

[000120] Em um aspecto, um método para a produção de um gene de anticorpo rearranjado em um camundongo geneticamente modificado é fornecido, que compreende: (a) a exposição de um camundongo geneticamente modificado a um antígeno, em que a modificação genética inclui um hVλ e um hJλ menos um sítio de cadeia leve endógeno, em que o sítio da cadeia leve endógeno compreende um gene Camundongo CL ou fragmento funcional do mesmo, e (b) a identificação de um gene de imunoglobulina rearranjado no referido camundongo, em que o gene de imunoglobulina rearranjado compreende uma cadeia leve λ do segmento do gene da região Variável e um gene CL ou seu fragmento funcional.

[000121] Em uma modalidade, o método compreende ainda uma sequência de ácido nucleico de clonagem que codifica uma região Variável da cadeia pesada e/ou cadeia leve do camundongo, em que a região Variável de cadeia pesada e/ou leve é um anticorpo que compreende Vλ humano e um camundongo CL.

[000122] Em uma modalidade, o gene de Camundongo CL ou o seu fragmento funcional, é selecionado a partir de um gene CL humano e um gene de camundongo CL, ou seu fragmento funcional.

[000123] Em uma modalidade, um método para a produção de um gene de anticorpo rearranjado em um camundongo geneticamente modificado é fornecido, que compreende: (a) a exposição de um camundongo geneticamente modificado a um antígeno, em que a modificação genética inclui um hVλ e um hJλ em um Sítio K de cadeia leve, em que o Sítio K de cadeia leve compreende um gene de

Camundongo Ck ou seu fragmento funcional, e (b) a identificação de um gene de imunoglobulina rearranjado no referido camundongo, em que o gene de imunoglobulina rearranjado compreende uma cadeia leve λ do segmento do gene da região Variável e um CK gene ou o seu fragmento funcional.

[000124] Em uma modalidade, o gene K constante de cadeia leve ou fragmento funcional destes é selecionado a partir de um gene CK humano e um camundongo do gene CK, ou um seu fragmento funcional.

[000125] Em uma modalidade, o método compreende ainda uma sequência de ácido nucleico de clonagem que codifica uma região Variável da cadeia pesada e /ou cadeia leve do camundongo, em que a região Variável de cadeia pesada e/ou de cadeia leve é a partir de um anticorpo que compreende V λ humano, e um camundongo C λ .

[000126] Em uma modalidade, um método para a produção de um gene de anticorpo rearranjado em um camundongo geneticamente modificado é fornecido, que compreende: (a) a exposição de um camundongo geneticamente modificado a um antígeno, em que a modificação genética inclui um hV λ e N λ , em um sítio λ de cadeia leve de camundongo, em que o sítio da cadeia leve λ compreende um gene de camundongo C λ , ou seu fragmento funcional, e (b) a identificação de um gene de imunoglobulina rearranjado no referido camundongo, em que o gene de imunoglobulina rearranjado compreende uma cadeia leve Variável λ do segmento de gene e uma região do gene C λ , ou seu fragmento funcional.

[000127] Em uma modalidade, o fragmento λ do gene constante de cadeia leve ou funcional destes é selecionado a partir de um C λ humano e um gene de camundongo C λ ou um seu fragmento funcional. Em uma modalidade específica, o gene λ constante de cadeia leve é um gene do camundongo C λ ou um seu fragmento funcional.

[000128] Em uma modalidade, o método compreende ainda uma

sequência de ácido nucleico de clonagem que codifica uma região Variável da cadeia pesada e/ou cadeia leve do camundongo, em que a região Variável de cadeia pesada e/ou de cadeia leve é um anticorpo que compreende V λ humano e um camundongo C λ .

[000129] Em um aspecto, um método para fazer um anticorpo é fornecido, que compreende expor um camundongo tal como descrito na presente invenção para um antígeno, permitindo que o camundongo possa montar uma resposta imune que compreende fazer um anticorpo que se liga especificamente ao antígeno, a identificação de uma sequência de ácido nucleico rearranjada no camundongo que codifica a cadeia pesada e uma sequência de ácido nucleico rearranjada no camundongo que codifica uma sequência do domínio Variável da cadeia leve cognata de um anticorpo, em que o anticorpo se liga especificamente ao antígeno, e emprega as sequências de ácido nucleico dos domínios de cadeia Variável pesada e leve fundidas com domínios constantes humanos para fazer um anticorpo desejado, em que o desejado anticorpo compreende uma cadeia leve que compreende um domínio hV λ , fundido com um domínio CL. Em uma modalidade, o domínio de V λ é humano e o domínio de CL é humano ou domínio de camundongo C λ . Em uma modalidade, o domínio de V λ é o camundongo e o domínio DE CL é humano ou domínio de camundongo CK.

[000130] Em uma modalidade, um método para fazer um anticorpo é fornecido, que compreende expor um camundongo tal como descrito na presente invenção para um antígeno, permitindo que o camundongo possa montar uma resposta imune que compreende fazer um anticorpo que se liga especificamente ao antígeno, a identificação de uma sequência de ácido nucleico rearranjada no camundongo que codifica uma cadeia pesada e uma sequência de ácido nucleico rearranjada do camundongo que codifica uma sequência do domínio variável de cadeia

leve cognata de um anticorpo, em que o anticorpo se liga especificamente ao antígeno, e empregando as sequências de ácidos nucleicos de cadeia pesada e leve fundidos com sequências de ácidos nucleicos de domínios constantes humanos para fazer um anticorpo desejado, em que o anticorpo desejado compreende uma cadeia leve que compreende um domínio hV λ fundido a um domínio C λ .

[000131] Em uma modalidade, um método para fazer um anticorpo é fornecido, que compreende expor um camundongo tal como descrito na presente invenção para um antígeno, permitindo que o camundongo possa montar uma resposta imune que compreende fazer um anticorpo que se liga especificamente ao antígeno, a identificação de uma sequência de ácido nucleico rearranjada no camundongo que codifica um domínio Variável de cadeia pesada e de uma sequência de ácido nucleico rearranjada que codifica uma sequência do domínio variável de cadeia leve cognata de um anticorpo, em que o anticorpo se liga especificamente ao antígeno, e empregando as sequências de ácidos nucleicos fundidos a sequências de ácidos nucleicos que codificam para um domínio constante de cadeia pesada humana e um domínio de cadeia leve constante humana para fazer um anticorpo derivado de sequências humanas, em que o anticorpo que se liga especificamente ao antígeno compreende uma cadeia leve que compreende hV λ humano, fundido com um domínio de região de camundongo C λ .

[000132] Em uma modalidade, a região do camundongo C λ é selecionada de entre CM, C λ 2 e C λ 3. Em uma modalidade específica, região de camundongo C λ 2.

[000133] Em um aspecto, um método para fazer uma sequência de gene da região Variável da cadeia leve rearranjada de anticorpo é fornecido, que compreende (a) a exposição de um camundongo tal como descrito na presente invenção para um antígeno, (b) permitir que o camundongo possa montar uma resposta imune, (c) a identificação de

uma célula no camundongo, que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de hVλ rearranjado humana de domínio fundido com um domínio de Camundongo CL, em que a célula também codifica uma cadeia pesada cognata compreendendo um domínio Vλ humano e um camundongo do domínio CH, e em que a célula expressa um anticorpo que se liga ao antígeno (d) a partir da clonagem de células de uma sequência de ácido nucleico que codifica para o domínio humano hVλ, e uma sequência de ácido nucleico que codifica para o domínio Vλ cognato humano, e, (e), utilizando a sequência de ácido nucleico clonado que codifica para o domínio hVλ humano, e a sequência de ácido nucleico clonado que codifica para o domínio de V λ cognato humano para fazer um anticorpo totalmente humano.

[000134] Em uma modalidade, um método para fazer uma sequência de gene da região Variável da cadeia leve rearranjada de anticorpo é fornecido, que compreende (a) a exposição de um camundongo conforme descrito na presente memória descritiva a um antígeno, (b) permitir que o camundongo possa montar uma resposta imune, (c) a identificação de uma célula do camundongo que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência hVλ rearranjada humana do domínio contíguo na molécula de ácido nucleico mesmo com uma sequência de ácido nucleico que codifica um domínio de camundongo CK, em que a célula também codifica uma cadeia pesada cognato compreendendo um domínio Vλ humano e um camundongo do domínio CH, e em que a célula expressa um anticorpo que se liga a antígeno, (d) a partir da clonagem de células de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica para o domínio Vλ humano e uma sequência de ácido nucleico que codifica o domínio Vλ cognato humano, e, (e), utilizando a sequência de ácido nucleico clonado que codifica para o domínio humano Vλ, e a sequência de ácido nucleico

clonada que codifica para o domínio $V\lambda$ cognato humano para fazer um anticorpo totalmente humano.

[000135] Em uma modalidade, um método para fazer uma sequência de gene da região Variável da cadeia leve rearranjada de anticorpo é fornecido, que compreende (a) a exposição de um camundongo tal como descrito na presente invenção para um antígeno, (b) permitir que o camundongo possa montar uma resposta imunitária ao antígeno, (c) a identificação de uma célula do camundongo que compreende DNA que codifica uma sequência do domínio humano rearranjado Vk - Ck fundido com um domínio de camundongo, em que a célula também codifica uma cadeia pesada cognata compreendendo um domínio de $V\lambda$ humano e um camundongo do domínio C, e em que a célula expressa um anticorpo que se liga ao antígeno (d) a partir de clonagem a célula de uma sequência de ácido nucleico que codifica para o domínio Vk humano rearranjado e uma sequência de ácido nucleico que codifica para o domínio $V\lambda$ cognato humano, e, (e), utilizando a sequência de ácido nucleico clonado que codifica para o domínio humano $hV\lambda$, e a sequência de ácido nucleico clonado que codifica para o domínio $V\lambda$ cognato humano fazendo um anticorpo totalmente humano. Em uma modalidade, o domínio de camundongo C é camundongo CK2. Em uma modalidade específica, o domínio de camundongo Ck é derivado de um gene de $C\lambda$, que é pelo menos 60 %, pelo menos 70 %, pelo menos 80 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, ou pelo menos 98 % idêntica à do camundongo CK2.

[000136] Em um aspecto, um camundongo geneticamente modificado desde que expressa uma cadeia leve humana, derivado fundido com uma região constante de cadeia leve endógena (CO), em que o camundongo, após imunização com o antígeno, faz um anticorpo que compreende um domínio Vk humano fundido com um domínio de Camundongo CL. Em uma modalidade, o domínio de Camundongo CL

é selecionado a partir de um domínio CK e um domínio do C λ . Em uma modalidade, o domínio de Camundongo CL é um domínio CK. Em uma modalidade, o domínio CL de camundongo é um domínio de certificação. Em uma modalidade específica, o domínio Ck é CK2. Em uma modalidade específica, o domínio de camundongo C λ é derivado de um gene C λ que é pelo menos 60 %, pelo menos 70 %, pelo menos 80 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, ou pelo menos 98 % idêntica para o camundongo CK2.

[000137] Em um aspecto, um camundongo geneticamente modificado compreendendo um sítio K endógeno modificado ou sítio K da cadeia leve como descrito na presente invenção, é proporcionado que expressa uma pluralidade de imunoglobulinas de cadeias leves k associadas com uma pluralidade de cadeias pesadas de imunoglobulina. Em uma modalidade, a cadeia pesada compreende uma sequência humana. Em várias modalidades, a sequência humana é selecionada a partir de uma sequência Variável, uma dobradiça CH1 a CH2 a CH3, e uma combinação dos mesmos. Em uma modalidade, a pluralidade de cadeias leves de imunoglobulina λ compreende uma sequência humana λ . Em várias modalidades, a sequência humana é selecionada a partir de uma sequência Variável, uma sequência constante, e uma combinação dos mesmos. Em uma modalidade, o camundongo compreende um local da imunoglobulina endógena deficiente e expressa a cadeia pesada e/ou a cadeia leve de um episoma transgene ou extracromossômico. Em uma modalidade, o camundongo compreende uma substituição de um local endógeno de camundongo de alguns ou de todos os segmentos de genes endógenos de camundongo da cadeia pesada (isto é, V, D, J), e/ou algumas ou todas as sequências constantes do camundongo endógeno da cadeia pesada (por exemplo, dobradiça CH1, CH2, CH3, ou uma dos mesmos), e/ou algumas ou todas as sequências do camundongo endógeno da cadeia

leve (por exemplo, V, J, constante, ou uma combinação), com uma ou mais sequências de imunoglobulinas humanas.

[000138] Em um aspecto, um camundongo adequado para a preparação de anticorpos que possuem uma cadeia leve derivada de λ humano é fornecido, em que todos ou substancialmente todos os anticorpos produzidos em camundongos são expressos com um λ humano derivado da cadeia leve. Em uma modalidade, uma cadeia leve derivada de λ humano é expressa a partir de um local endógeno da cadeia leve. Em uma modalidade, o sítio da cadeia leve endógena é um sítio de cadeia leve K. Em uma modalidade específica, o sítio de cadeia leve K é um Sítio K de camundongo de cadeia leve.

[000139] Em um aspecto, um método para fazer uma cadeia leve derivada de λ humano para um anticorpo humano é proporcionado, compreendendo a obtenção de um camundongo tal como descrito na presente invenção de uma sequência de cadeia leve e uma sequência de cadeia pesada, e empregando a sequência de cadeia leve e cadeia pesada ao fazer um anticorpo humano.

[000140] Em um aspecto, um método para a produção de uma proteína de ligação ao antígeno é fornecido, que compreende a exposição de um camundongo tal como descrito na presente invenção para um antígeno, permitindo que o camundongo possa montar uma resposta imune, e obtenção do camundongo de uma proteína de ligação ao antígeno que se liga ao antígeno, ou a obtenção de uma sequência com o camundongo a ser utilizado na realização de uma proteína de ligação ao antígeno que se liga ao antígeno.

[000141] Em um aspecto, uma célula derivada de um camundongo, tal como descrito na presente invenção é proporcionada. Em uma modalidade, a célula é selecionada a partir de uma célula estaminal embrionária, uma célula pluripotente, uma célula pluripotente induzida, uma célula B, e uma hibridoma.

[000142] Em um aspecto, é fornecido uma célula que compreende uma modificação genética como descrito na presente invenção. Em uma modalidade, a célula é uma célula de camundongo. Em uma modalidade, a célula é selecionada a partir de uma hibridoma e uma quadroma. Em uma modalidade, a célula expressa uma cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma sequência Variável λ humana fundida com uma sequência de camundongo constante. Em uma modalidade específica, a sequência de camundongo constante é uma sequência K de camundongo constante.

[000143] Em um aspecto, um tecido derivado de um camundongo, tal como descrito na presente invenção é proporcionado.

[000144] Em um aspecto, a utilização de um camundongo ou de uma célula, tal como descrito na presente invenção para fazer uma proteína de ligação ao antígeno é fornecida. Em uma modalidade, a proteína de ligação ao antígeno é uma proteína humana. Em uma modalidade, a proteína humana é um anticorpo humano.

[000145] Em um aspecto, uma proteína de ligação ao antígeno, feita por um camundongo, células, tecidos ou método, tal como descrito na presente invenção é proporcionada. Em uma modalidade, a proteína de ligação ao antígeno é uma proteína humana. Em uma modalidade, a proteína humana é um anticorpo humano.

[000146] As modalidades e aspectos descritos na presente invenção podem ser utilizados em conjunto um com o outro, a menos que seja de um outro modo indicado ou evidente a partir do contexto. Outras modalidades serão evidentes para aqueles que são versados na técnica a partir de uma revisão da descrição que se segue.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[000147] A figura 1 mostra uma ilustração detalhada, sem escala, do local ser da cadeia leve λ humano, incluindo os conjuntos de segmentos de genes, hV λ (A, B e C) e a J λ e pares de região C λ (pares J a C)

[000148] A figura 2 mostra uma ilustração geral, sem escala, de uma estratégia de orientação utilizada para inativar o sítio da cadeia leve λ de camundongo endógeno.

[000149] A figura 3 mostra uma ilustração geral, sem escala, de uma estratégia de orientação utilizada para inativar o sítio K da cadeia leve de camundongo endógeno.

[000150] A figura 4A mostra uma ilustração geral, sem escala, de um vetor inicial para a segmentação visando o sítio da cadeia leve λ do camundongo endógeno com sequências de cadeia leve λ humanas incluindo segmentos do gene 12 hV λ e segmento de gene hJ λ 1 (Vetor alvo 12/1 - λ).

[000151] A figura 4B mostra uma ilustração geral, sem escala, de quatro vetores iniciais de segmentação para direcionar o Sítio K da cadeia leve de camundongo endógeno com sequências de cadeias leves λ humanas, incluindo os segmentos do gene 12 hV λ e o segmento de gene hJ λ 1 (Vetor alvo 12/1 - λ), 12 segmentos de gene hV λ , e hJ λ 1, 2, 3 e 7 segmentos de gene (Vetor alvo 12/4-k), 12 segmentos de genes hV λ , uma sequência de gene humano V k -J k e segmento de gene h λ 1 (Vetor alvo 12 (K) 1- K) e 12 segmentos de gene hV λ ., uma sequência de gene humana V k a J k e hJ λ 1, 2, 3 e 7 segmentos de genes (Vetor de alvo 12 (K) 4-k).

[000152] A figura 5A mostra uma ilustração geral, sem escala, de uma estratégia de orientação para progressiva inserção de 40 hV λ segmentos de genes e um segmento de gene hJ λ único para o sítio da cadeia leve k do camundongo.

[000153] A figura 5B mostra uma ilustração geral, sem escala, de uma estratégia de orientação para progressiva inserção de 40 hV λ . segmentos de gene e um segmento de gene hJ λ único no sítio K camundongo.

[000154] A figura 6 mostra uma ilustração geral, sem escala, de etapas

de orientação e de engenharia molecular empregadas para fazer os vetores híbridos de segmentação humanos únicos λ -k para o constructo de um lugar híbrido da cadeia leve contendo uma sequência K humana intergênica, os segmentos do gene múltiplos hJλ ou em ambos.

[000155] A figura 7A mostra uma ilustração geral, sem escala, da estrutura do local para um local modificado de camundongo λ da cadeia leve contendo 40 segmentos de gene hVλ. e um segmento de gene único hJλ operativamente ligado ao gene Cλ2 endógeno.

[000156] A figura 7B mostra uma ilustração geral, sem escala, da estrutura do local para quatro locais independentes, modificados de cadeia leve k de camundongo contendo 40 segmentos de gene hVλ. e uma ou quatro segmentos de genes hJλ com ou sem uma sequência contígua Vλ a Jλ de gene humana operativamente ligado ao gene CK endógeno.

[000157] A figura 8A mostra os gráficos de contorno de esplenócitos de Igλ* e Igk* ligados ao CD19 + a partir de um camundongo de tipo selvagem (WT), um homozigoto do camundongo durante 12 hVλ, e quatro segmentos de genes hJλ incluindo uma sequência de gene humana Vk a Jk (12hV2 a V a KJλ a 4hJλ) e um homozigoto de camundongo para 40 hVλ. e um segmento de gene hJλ (40hVλ a 1hJλ).

[000158] A figura 8B mostra o número total de células CD19 + B no baço colhidas a partir de tipo selvagem (WT), camundongos homozigóticos para 12 segmentos de genes hVλ. e quatro segmentos de gene hJλ, incluindo uma sequência de gene humana hJλ (12hVλ. a Vidx a 4hJλλ) e camundongos homozigotos para 40 hVλ e um segmento de gene hJλ (40hVλ. a 1hJλλ).

[000159] A figura 9A, no painel superior, mostra os gráficos de contorno fechado em esplenócitos de singletos e coradas para células B e T (CD19 + e CD3 +, respectivamente) de um camundongo de tipo selvagem (WT) e um homozigoto do camundongo durante 40

segmentos de genes hVλ. e quatro segmentos de genes Jλ, incluindo uma sequência de gene humana Vk a Jk (40hVλ. a Vk Jλ a 4hJλ). O painel inferior mostra os gráficos de contorno de esplenócitos em torno em CD19 + e corados para expressão de IG λ* e Ig λ* de um camundongo de tipo selvagem (WT) e um homozigoto do camundongo dentre 40 segmentos de genes hVλ e quatro segmentos de gene Jλ incluindo uma sequência de gene humana Vk a Jk (40hVλ a VKJλ a 4hJλλ).

[000160] A figura 9B mostra o número total de células CD19 +, CD19 + IGk+ e CD19+ IGλ * de células B no baço colhidas a partir de camundongos do tipo selvagem (WT) e camundongos homozigóticos para 40 segmentos de gene hVλ e quatro segmentos de gene Jλ incluindo uma sequência de gene humana Vλ a Jλ (40hVλ -VkJk-4hJλ).

[000161] A figura 9C mostra o contorno de parcelas de esplenócitos em torno de CD19 + e corados para a imunoglobulina D (IgD) e imunoglobulina M (IgM) a partir de um camundongo de tipo selvagem (WT) e um homozigoto do camundongo durante 40 segmentos de gene hVλ e quatro segmentos de gene Jλ incluindo uma sequência de gene Vk-Jk humano (40hVλ.-VKJk-4hJλ). As células maduras (72 por WT, 51 para 40hVλ -VkJk-4hJλλ) e de transição (13 para WT, 22 para 40hVλ -VkJk-4hJλλ)) as células B são anotadas em cada um dos gráficos de contorno.

[000162] A figura 9D mostra o número total de células CD19 + células B, células B de transição (CD19 + Ig^{hi}IgD^{lo}) e células B maduras (CD19+ Ig^{lo}IgD^{hi}) em baços colhidos a partir de camundongos do tipo selvagem (WT) e camundongos homozigóticos para 40 hVλ, e quatro segmentos de genes Jλ, incluindo uma sequência de gene humana Vk-Jk (40hVλ. -VkJk-4hJλ).

[000163] A figura 10A, no painel superior, mostra os gráficos de contorno de manchado de medula óssea para células B e T (CD19 + e

CD3 +, respectivamente) de um camundongo de tipo selvagem (WT) e de um camundongo homozigótico durante 40 segmentos de genes hVλ. e quatro segmentos de genes Jλ, incluindo uma sequência de gene humana V_k a J_k (40hVλ. a V λ J a k a 4hJλ). O painel inferior mostra gráficos de contorno de medula óssea CD19 + em torno coradas para ckit+ e CD43+ a partir de um camundongo de tipo selvagem (WT) e um camundongo homozigoto para 40 segmentos de gene hVλ e quatro segmentos de gene Jλ incluindo uma sequência de gene humana Vλ a Jλ (40hVλ. a VKJλ a 4hJλ). As células pré- e Pró- B são anotadas nos gráficos de contorno do painel de fundo.

[000164] A figura 10B mostra o número de células B Pro (CD19 + CD43 + ckit +) e Pré (CD19 + CD43 ckit+) B na medula óssea colhidas a partir dos fêmures de camundongos do tipo selvagem (VVT) e camundongos homozigóticos para 40 segmentos de genes hVλ e quatro segmentos de genes J2, incluindo uma sequência de gene humana V_k-J_k (40 hVλ.VkJk-4hJλ).

[000165] A figura 10C mostra os gráficos de contorno de medula óssea em torno de singletos corados para imunoglobulina M (IgM) e B220 a partir de um camundongo de tipo selvagem (WT) e de um camundongo durante 40 segmentos de genes homozigóticos hVλ. e quatro segmentos de genes Jλ incluindo uma sequência de gene humana V_k a J_k (40hVλ. a Vidx a 4hJλ). As células pro/pre B imaturas, maduras e são anotadas em cada um dos gráficos de contorno.

[000166] A figura 10D mostra o número total de células B imaturas (B220^{Int}IgM⁺) e maduras (B220^{hi}IgM⁺) na medula óssea isolada a partir dos fêmures de camundongos do tipo selvagem (WT) e camundongos homozigóticos para 40 segmentos de genes hVλ e quatro segmentos de genes Jλ incluindo uma sequência de gene humana Vλ a Jλ (40hVλ - V_kJ_k-4hJλ).

[000167] A figura 10E mostra os gráficos de contorno de medula óssea

em torno das células B imaturas ($B220^{hi}IgM+$) e maduras ($B220^{hi}IgM+$) coradas para a expressão de Ig λ e Igk isoladas dos fêmures de um camundongo de tipo selvagem (WT) e um homozigoto do camundongo durante 40 segmentos de gene hV λ e quatro segmentos de genes J λ incluindo a sequência de gene humana Vk-Jk (40hV λ .-VkJk-4hJ λ .).

[000168] A figura 11 mostra um alinhamento de sequências de nucleotídeos da junção V λ –J λ -Ck de 18 independentes dos clones RT a PCR amplificados a partir de clones de RNA de esplenócitos de sequências de genes de cadeia leve de camundongos portadores humano λ a um sítio K da cadeia leve de camundongo endógeno. A6 = SEQ ID NO: 57; B6 = SEQ ID NO: 58; F6 = SEQ ID NO: 59; B7 = SEQ ID NO: 60; E7 = SEQ ID NO: 61; F7 = SEQ ID NO: 62; C8 = SEQ ID NO: 63; E12 = SEQ ID NO: 64; 1 a 4 = SEQ ID NO: 65; 1 a 20 = SEQ ID NO: 66; 3B43 = SEQ ID NO: 67; 5 a 8 = SEQ ID NO: 68; 5 a 19 = SEQ ID NO: 69; 1010 = SEQ ID NO: 70; 11A1 = SEQ ID NO: 71; 7A8 = SEQ ID NO: 72; 3A3 = SEQ ID NO: 73; 2 a 7 = SEQ ID NO: 74. As bases em letras minúsculas indicam as bases não germinativas resultantes ou de mutação e/ou da adição N durante a recombinação. Os aminoácidos de consenso dentro da região da estrutura 4 (FWR4) codificados por meio da sequência de nucleotídeos de hJ λ 1 e camundongo CK são observados no fundo do alinhamento de sequências.

[000169] A figura 12 mostra um alinhamento da sequência de nucleotídeos da junção V λ -J λ -Ck de 12 independentes de RT a PCR amplificados a partir de clones de RNA de esplenócitos de camundongos portadores humanos leves λ sequências de genes de cadeia, incluindo uma sequência contígua Vk a Jk de gene humana em um Sítio K camundongo endógeno de cadeia leve. 5 a 2 = SEQ ID NO: 87; 2 a 5 = SEQ ID NO: 88; 1 a 3 = SEQ ID NO: 89; 4B a 1 = SEQ ID NO: 90; 3B a 5 = SEQ ID NO: 91; 7A a 1 = SEQ ID NO: 92; 5 \neg 1 = SEQ ID NO: 93; 4A a 1 = SEQ ID NO: 94; 11A a 1 = SEQ ID NO: 95; 5 a 7 =

SEQ ID NO: 96; 5 a 4 = SEQ ID NO: 97; 2 a 3 = SEQ ID NO: 98. As bases em letras minúsculas indicam as bases não germinativas resultantes ou de mutação e/ou de adição N durante a recombinação. Os aminoácidos de consenso dentro da região da estrutura 4 (FWR4) codificados pela sequência de nucleotídeos de cada J λ humano e do camundongo CK são observados no fundo do alinhamento das sequências.

[000170] A figura 13 mostra um alinhamento da sequência de nucleotídeos da junção de V λ –J λ -C λ de três clones independentes de RT a PCR amplificados a partir de clones de RNA de esplenócitos de camundongos suportando os locais das sequências do gene da cadeia leve λ humanos, e das sequências do gene da cadeia leve λ de camundongo endógeno. 2D1 = SEQ ID NO: 101; 2D9 = SEQ ID NO: 102; 3E15 = SEQ ID NO: 103. As bases em letras minúsculas indicam as bases não germinativas resultantes ou de mutação e/ou da adição de N durante a recombinação. Os aminoácidos de consenso dentro da região de estrutura 4 (FWR4) codificados pela sequência de nucleotídeos de hJ λ 1 e C λ 2 de camundongo são indicados na parte inferior do alinhamento de sequências.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[000171] Embora as características específicas das várias modalidades são discutidas em pormenores, as descrições dos aspectos específicos, as modalidades e os exemplos não limitam o objetivo das reivindicações, são as reivindicações que descrevem o âmbito da presente invenção. Todos os termos e expressões utilizados na presente memória descritiva incluem os significados a eles atribuídos, normalmente na técnica.

[000172] O termo "contíguo" inclui referência a ocorrência na mesma molécula de ácido nucleico, por exemplo, duas sequências de ácidos nucleicos são "contíguas" se ocorrerem na mesma molécula de ácido

nucleico mas são interrompidos por uma outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, uma sequência rearranjada V (D) J é "contígua" a uma sequência de região constante de genes, ainda que o códon final da sequência V (D) J não seja imediatamente seguido pelo primeiro códon da sequência da região constante. Em outro exemplo, as duas sequências de segmento de gene V são "contíguas" se ocorrerem no mesmo fragmento do gene, embora elas possam ser separadas por meio de uma sequência que não codifica um códon da região V, por exemplo, eles podem ser separados por uma sequência reguladora, por exemplo, um promotor ou uma sequência não codificadora de outra. Em uma modalidade, uma sequência contígua inclui um fragmento do gene contendo as sequências de genes arranjadas como encontradas em um genoma de tipo selvagem.

[000173] A frase "derivado de", quando utilizado sobre uma região Variável "derivado a partir de" um gene ou um segmento de gene citado inclui a capacidade para detectar a sequência de volta para um segmento de gene particular não rearranjado ou segmentos de genes que foram rearranjados para formar um gene que expressa o domínio Variável (que corresponde, se for caso disso, as diferenças de fatiamento e mutações somáticas).

[000174] A frase "funcional" quando utilizado sobre um segmento de gene da região Variável ou junta ao segmento de gene refere-se à utilização de um repertório de anticorpos expressos; por exemplo, em segmentos de genes humanos Vλ 3 a 1, 4 a 3, 2 a 8, etc são funcionais, enquanto que os segmentos de gene Vλ 3 a 2, 2 a 5, 3 a 4, etc, são não funcionais

[000175] O "sítio de cadeia pesada", inclui uma localização em um cromossoma, por exemplo, um cromossoma do camundongo, em que em uma Variável da cadeia pesada de tipo selvagem de camundongo (Vλ), a diversidade de cadeia pesada (DH), a junção de cadeia pesada

(J $\lambda\lambda$), e constantes de cadeia pesada (CH) das sequências de da região de DNA são encontradas.

[000176] O "sítio K" inclui uma localização em um cromossoma, por exemplo, um cromossoma do camundongo, em que em uma variável k de camundongo de tipo selvagem (V λ), junção de K (J k), e K constantes (C k) das sequências de da região de DNA são encontrados.

[000177] O "sítio λ " inclui uma localização em um cromossoma, por exemplo, um cromossoma do camundongo, em que em uma Variável de tipo selvagem λ de camundongo (V λ), a junção de λ (J $\lambda\lambda$), e a constante λ (C λ .) das sequências da região de DNA são encontradas.

[000178] O termo "não rearranjados" inclui o estado do local de uma imunoglobulina em que os segmentos de gene V e segmentos de genes J (para as cadeias pesadas, os segmentos do gene D, bem como) são mantidos em separado, mas são capazes de serem unidos com a finalidade de formar um gene rearranjado V(D) J que compreende um único V, (D), J do repertório V (D) J.

Camundongos Expressando domínios Variáveis λ Humanos

[000179] Os camundongos que expressam os anticorpos que são totalmente humano, ou parcialmente humanos e parcialmente camundongo, foram anteriormente reportados. Os camundongos geneticamente modificados VELOCALMMUNE ® compreendem uma substituição de segmentos de genes não rearranjados V (D) J no local dos segmentos de genes de camundongo endógenos com V (D) J humanas. Os camundongos VELOCALMMUNE ® expressam os anticorpos quiméricos possuindo os domínios Variáveis humanos e os domínios constantes de camundongo (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 7.605.237). A maioria dos relatos falam de outros camundongos que expressam a preocupação de anticorpos completamente humanos de transgenes plenamente humanos em camundongos que desabilitaram o local de imunoglobulinas endógenas.

[000180] As cadeias leves de anticorpos são codificadas por um dos dois locais distintos: kappa (k) e lambda (λ). As cadeias leves de anticorpos de camundongo são principalmente do tipo K. Os camundongos que produzem anticorpos de camundongo e camundongos modificados que fazem o camundongo totalmente humanos ou quiméricos humano, exibem um viés na utilização da cadeia leve. Os seres humanos também apresentam um viés de cadeia leve, mas não é tão pronunciado como no camundongo, a proporção de cadeias leves K para as cadeias leves λ em camundongos é de cerca de 95:5, enquanto nos seres humanos, a proporção é de cerca de 60:40. A orientação mais pronunciada em camundongos é não pensada para afetar gravemente a diversidade dos anticorpos, porque no camundongo no sítio Variável λ não é tão diverso, em primeira instância. Isto não é assim em seres humanos. O sítio da cadeia leve λ humano é rico em diversidade.

[000181] O sítio da cadeia leve λ humano se estende por 1000 kb e contém mais de 80 genes que codificam as Variáveis (V), ou as juntas (J) (Figura 1). Dentro do sítio da cadeia leve λ humano mais da metade de todos os domínios observados são codificados por meio dos segmentos do gene 1 a 40, 1 a 44, 2 a 8, 2 a 14, e 3 a 21. Globalmente, cerca de 30 ou mais dos segmentos de genes humanos V λ acredita-se ser funcional. Há sete segmentos de genes J λ , apenas quatro dos quais são considerados como segmentos de genes J λ geralmente funcionais a J λ 1, J λ 2, J λ 3, e J λ 7.

[000182] O sítio de cadeia leve λ humano é semelhante em estrutura ao sítio K tanto em camundongos quanto em seres humanos, em que o sítio da cadeia leve λ humano tem vários segmentos de genes da região Variável, que são capazes de recombinar para formar uma proteína de cadeia leve funcional. O sítio da cadeia leve λ humano contém aproximadamente 70 segmentos de gene V e 7 segmentos de genes de

pares de J λ a Ck. Apenas quatro desses pares de segmentos de genes J λ a Ck parecem ser funcionais. Em alguns alelos, um quinto par de segmento de gene J1 a CA, é declaradamente um pseudo gene (C λ 6). 70 segmentos de genes hV λ parecem conter 38 segmentos de genes funcionais. As 70 sequências de Vk são dispostas em três grupos, os quais contêm os diferentes membros distintos dos grupos de genes da família V (grupos A, B e C FIG 1). Esta é uma fonte rica potencial de diversidade relativamente inexplorado para a geração de anticorpos com regiões V humanas em animais não em humanos.

[000183] Em contraste, o sítio da cadeia leve λ humano contém apenas dois ou três (Dependendo da cepa) de segmentos de genes de camundongo da região Vk (Figura 2). Pelo menos, por este motivo, a tendência K grave em camundongos não está pensada para ser particularmente prejudicial para a diversidade de anticorpo total.

[000184] De acordo com os mapas publicados do sítio da cadeia leve λ de camundongo, o local é constituído essencialmente por dois conjuntos de segmentos de genes dentro de um intervalo de cerca de 200 kb (Figura 2). Os dois grupos contêm dois conjuntos de genes V, J e C que são capazes de rearranjo independente: VK2 a J λ 2 a CK2 a J λ 4 a CK4 e V λ 1 a J λ 3 a C λ 3 a J λ 1 a CK1. Embora V λ 2 foi encontrado para recombinar com todos os segmentos de genes, J λ , V λ 1 parece exclusivamente recombinar com CK1. CK4 acredita-se ser um pseudo gene defeituoso com sítios de splice.

[000185] O camundongo Sítio K da cadeia leve é muito diferente. A estrutura e o número de segmentos de genes que participam nos eventos de recombinação que conduzem a uma proteína funcional de cadeia leve K do camundongo local é muito mais complexa (Figura 3). Dessa maneira, o camundongo e cadeias leves não contribuem muito para a diversidade de uma população de anticorpos em um camundongo normal.

[000186] A exploração da rica diversidade do sítio da cadeia leve λ humana em camundongos seria provável resultar em, entre outras coisas, uma fonte de um repertório mais completo humano de domínios V de cadeia leve. As tentativas anteriores de explorar esta diversidade utilizaram os transgenes humanos que contêm pedaços do sítio da cadeia humana leve λ aleatoriamente incorporado no genoma do camundongo (vide, por exemplo, EUA 6998514 e EUA 7.435.871). Os camundongos que contêm estes transgenes aleatoriamente integrados supostamente expressam as cadeias leves λ totalmente humanas, no entanto, em alguns casos, um ou ambos do sítio de cadeia leve endógeno permanecem intactos. Esta situação não é desejável, como as sequências de cadeia leve λ humanas competem com a cadeia leve de camundongo (λc ou λ) no repertório de anticorpos expresso do camundongo.

[000187] Em contraste, os inventores descrevem os camundongos geneticamente modificados que são capazes de expressar uma ou mais sequências de ácidos nucleicos de cadeia leves λ diretamente a partir de um sítio de cadeia leve de camundongo, incluindo a substituição de um local de camundongo da cadeia leve endógeno. Os camundongos geneticamente modificadas capazes de expressar as sequências de cadeia leve humanas λ a partir de um local endógeno pode ser adicionalmente produzido a camundongos que compreendem um sítio de cadeia pesada humana e, dessa maneira, serem utilizados para expressar os anticorpos que compreende as regiões V (pesada e leve), que são totalmente humanos. Em várias modalidades, as regiões V expressam-se com as regiões do camundongo constantes. Em várias modalidades, os segmentos de gene de imunoglobulina não endógena de camundongo estão presentes e as regiões V expressam com as regiões constantes humanas. Estes anticorpos seriam úteis em numerosas aplicações, tanto de diagnóstico como também terapêutica.

[000188] Muitas vantagens podem ser realizadas por meio de várias modalidades de expressão de proteínas de ligação derivadas de $V\lambda$ humana e segmentos de genes $J\lambda$ em camundongos. As vantagens podem ser realizadas através da colocação de sequências humanas λ em um local endógeno da cadeia leve, por exemplo, o local do camundongo K ou λ . Os anticorpos produzidos a partir de camundongos tais podem ter cadeias leves que compreendem os domínios $V\lambda$ humanos fundidos com uma região de Camundongo CL, especificamente uma região de camundongo CK ou C λ . Os camundongos também expressam os domínios $V\lambda$ humanos que são adequados para a identificação e clonagem para uso com regiões de CL humanos, especificamente as regiões CK e/ou C λ . Porque o desenvolvimento de células B em camundongos tal é de outro modo normal, é possível gerar domínios $V\lambda$ compatíveis (incluindo domínios $V\lambda$ somaticamente mutados) no contexto de uma das C λ λ , ou regiões de CK.

[000189] Os camundongos geneticamente modificados são descritos que compreende um segmento de gene não rearranjado $V\lambda$ de imunoglobulina ou um Sítio K de cadeia leve λ , Os camundongos que expressam os anticorpos que compreendem uma cadeia leve possuindo um domínio $V\lambda$ humano fundido com uma região CK e/ou C λ são descritos.

Transcrições estéreis do Sítio K de cadeia leve de Imunoglobulina

[000190] As Variações sobre o tema da expressão de sequências de imunoglobulina humana nos camundongos λ refletem-se várias modalidades de camundongos geneticamente modificadas capazes de tal expressão. Dessa maneira, em algumas modalidades, os camundongos geneticamente modificados compreendem sequência não codificante determinada (s) a partir de um local humano. Em uma modalidade, o camundongo geneticamente modificado compreende $V\lambda$

humano. J λ e segmentos de gene endógeno, a um sítio de cadeia leve K, e compreende ainda um ser humano K luz fragmento do gene de cadeia λ . Em uma modalidade específica, o humano K luz fragmento do gene de cadeia é uma sequência não codificadora encontrado naturalmente entre um segmento de gene VK humana e um segmento de gene humano J λ .

[000191] O sítio K de cadeia leve do camundongo e humano contém sequências que codificam os transcritos estéreis que não possuem um ou outro códon de início de um ou uma estrutura de leitura aberta, e que são considerados como elementos que regulam a transcrição do sítio da cadeia K leve. Estes transcritos estéreis surgir a partir de uma sequência a jusante intergênicas localizados ou 3' do segmento mais proximal e Vk gene a montante ou a 5' da cadeia leve K intrônica potenciador (EKI) que fica a montante do gene da cadeia leve K região constante (CK). As transcrições estéreis surgem de rearranjo da sequência intergênica de modo a formar um segmento de VKJ λ 1 fundido a um CK.

[000192] A substituição do sítio de cadeia leve K a montante do gene CK iria remover a região intergênica codificando as transcrições estéreis. Por conseguinte, em diversas modalidades, uma substituição de sequência de camundongo de cadeia K leve a montante do gene do camundongo com CK humano λ segmentos de gene de cadeia leve que resultaria em um camundongo humanizado Sítio K de cadeia leve que contém humano Vk e segmentos de genes J λ , mas não a região de cadeia leve K intergênica que codifica as transcrições estéreis.

[000193] Tal como descrito na presente a humanização, do camundongo endógeno Sítio K de cadeia leve λ com humanos, os segmentos de gene de cadeia leve, em que a humanização remove a região intergênica, resulta em uma diminuição notável na utilização do sítio de cadeia leve K, juntamente com um marcado aumento na

utilização λ cadeia leve. Portanto, apesar de um camundongo humanizado que carece da região intergênica ser útil na medida em que podem produzir anticorpos humanos com os domínios de cadeia leve Variável (por exemplo, λ, humanos ou domínios K), a utilização do local diminui.

[000194] Também é descrita a humanização do sítio K de camundongo endógeno da cadeia leve com V humana λ. λ e segmentos de genes Jλ, juntamente com uma inserção de uma região intergênica K humana para criar um sítio Vk que contém, no que diz respeito à transcrição, entre o segmento de gene humano Vk final e o segmento de primeiro gene humano Jλ, a região intergênica, K o qual exibe uma população de células B com uma maior expressão de um local que carece da região intergênica K. Esta observação é consistente com a hipótese de que a região intergênica diretamente através de uma transcrição estéril, ou indiretamente a partir da utilização suprime endógeno λ. sítio de cadeia leve. Sob tal hipótese, incluindo a região intergênica resultaria em uma diminuição da utilização do sítio da cadeia k endógeno luz, deixando o camundongo uma escolha restrita, mas para empregar o modificado (em λ) local para gerar anticorpos.

[000195] Em várias modalidades, a substituição de sequência de camundongo da cadeia K leve a montante do gene humano Camundongo Ck com sequência da cadeia leve λ compreende ainda um ser humano K região intergênica cadeia leve disposta, em relação à transcrição, entre a região 3' não traduzida da extremidade 3' do segmento do gene Vk e mais a 5' do primeiro humano Jλ segmento de gene. Alternativa mente, uma região tão intergênica pode ser omitido de um endógeno substituídos K sítio de cadeia leve (a montante do gene Camundongo Ck) fazendo uma deleção no sítio da cadeia endógeno 2 luz. Do mesmo modo, no âmbito do presente exemplo de realização, o camundongo gera anticorpos a partir de um sítio de cadeia endógeno K

leve contendo humanos λ sequências de cadeia leve.

Abordagens para os Camundongos de engenharia que Expressam os Domínios hVλ Humanos.

[000196] Várias abordagens para tornar os camundongos geneticamente modificadas que produzem anticorpos que contenham uma cadeia leve que possui um domínio Vλ humano fundido com uma região endógeno Cr (por exemplo, CK ou Cλ λ ,) são descritos. Modificações genéticas são descritas que, em várias modalidades, compreendem uma deleção de um ou de ambos o sítio de cadeia leve endógenos. Por exemplo, para eliminar a camundongo λ As cadeias leves do repertório de anticorpos endógenos uma deleção de um primeiro V_k a J_λ a C_λ λ , agrupamento de genes de substituição e, em todo ou em parte, dos segmentos de genes J_λ Vλ a de um aglomerado de genes humanos em segundo lugar com segmentos V_k a J_λ gene pode ser feita. Os embriões de camundongos geneticamente modificados, células e constructos de segmentação para fazer os camundongos, embriões de camundongos e células também são fornecidos.

[000197] A eliminação de uma endógeno Vλ a J_λ a CA, agrupamento de genes de substituição dos Segmentos de gene de um agrupamento de genes Vλ -J_λ -C_λ emprega a interrupção relativamente mínima no singular anticorpo associação da região constante e função no animal, em várias modalidades, porque os genes endógenos de CA, são deixados intactos e, portanto, manter a funcionalidade normal e capacidade de se associar com a região constante de uma cadeia pesada endógeno. Dessa maneira, em tais modalidades a modificação não afeta outras regiões constantes da cadeia pesada endógenas dependentes de regiões constantes de cadeia leve funcional para a montagem de uma molécula de anticorpo funcional que contém duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Além disso, em várias

modalidades a modificação não afeta a montagem de uma molécula de anticorpo ligado à membrana funcional envolvendo uma cadeia endógeno pesada e uma cadeia leve, por exemplo, um hV λ , domínio ligado a uma região de camundongo C λ . Pelo menos, um gene funcional C λ é retido no local endógeno, animais que contêm uma substituição de segmentos de genes de V λ a J λ de um agrupamento de genes endógenos V λ a J λ – C λ , com humanos segmentos de genes V λ a J λ deve ser capaz de fazer as cadeias leves normais λ que são capazes de ligação ao antígeno, durante uma resposta imunitária através do segmentos de genes V λ a J λ humanos presentes no repertório de anticorpos expresso do animal.

[000198] Uma ilustração esquemática (sem escala) de um camundongo endógeno excluído V λ a J λ . a C λ agrupamento de genes é proporcionado na Figura 2. Como ilustrado, o camundongo λ sítio da cadeia leve está organizado em dois grupos de genes, os quais contêm segmentos de função do gene capazes de recombinar para formar uma função de cadeia leve de camundongo λ . O camundongo endógeno V λ 1 a J λ 3 a C λ 3 a J λ 1 a C λ , gene do grupo 1 é eliminado por um constructo de segmentação (Segmentação Vetor 1) com um cassete de neomicina ladeado por local de recombinação. O outro agrupamento do gene endógeno (V λ 2 a V λ 3 a J λ 2 a C λ 2 a J λ 4 a C λ 4) é eliminado em parte por um constructo de segmentação (Segmentação Vetor 2) com um cassete quinase higromicina timidina a flanqueado por sítios de recombinação. Neste segundo evento de segmentação, os segmentos de genes C λ 2 a J λ 4 a C λ 4 endógenos são retidos. Um segundo constructo de segmentação (Vetor alvo 2) é construído utilizando local de recombinação que são diferentes do que aqueles no primeiro constructo de segmentação (Vetor alvo 1) permitindo assim a eliminação seletiva do cassete de seleção depois de uma segmentação foram bem sucedidas. O local resultante duplo segmentado está

funcionalmente silenciado em que nenhuma cadeia leve λ endógeno pode ser produzido. Este local modificado pode ser utilizado para a inserção de $V\lambda$ humana e $J\lambda$ segmentos de genes para criar um camundongo endógeno λ lócus compreendendo $V\lambda$ humana e segmentos de genes $J\lambda$, em que, após a recombinação no local modificado, o animal produz cadeias leves compreendendo λ rearranjado $V\lambda$ humana e segmentos de genes $J\lambda$ ligados a um camundongo endógeno CA, segmento de gene.

[000199] O camundongo geneticamente modificado para tornar os segmentos de genes endógenos λ não funcionais, em várias modalidades, resulta em um camundongo que apresenta exclusivamente as cadeias leves K do seu repertório de anticorpos, tornando a o camundongo útil para avaliar o papel das cadeias leves λ na resposta imune e útil para fazer um repertório de anticorpos compreendendo os domínios Vk mas não $hV\lambda$, domínios.

[000200] Um camundongo geneticamente modificado que expressa um $hV\lambda$ ligado a um gene de camundongo $C\lambda$ tendo sido recombinados no camundongo endógeno λ sítio de cadeia leve pode ser feita por qualquer método conhecido na técnica. Uma ilustração esquemática (sem escala) de substituição do camundongo endógeno segmentos $VK2$ a $VK3$ a $J\lambda$ 2 genes com $V\lambda$ humano e segmentos de genes $J\lambda$ é proporcionado na Figura 4 λ . Como ilustrado, um camundongo endógeno λ sítio de cadeia leve, que tinham sido tornadas não a funcionais é substituído por um constructo de direcionamento (12/1 a k Vetor alvo), que inclui um cassete de neomicina flanqueada por local de recombinação. O gene $VK2$ a $V\lambda$ 3 a $J\lambda$ 2 segmentos são substituídos por um fragmento do gene contendo λ humano de sequência que inclui 12 segmentos de gene $hV\lambda$ e um segmento de gene único $hJ\lambda$.

[000201] Deste modo, esta primeira abordagem das posições de um ou mais segmentos de genes $hV\lambda$ no λ endógeno, sítio de cadeia leve

contíguo com um segmento de gene único hJ λ (Figura 4A).

[000202] Outras modificações para o sítio da cadeia leve λ endógeno modificada pode ser conseguido com a utilização de técnicas semelhantes para inserir os segmentos de genes mais hV λ . Por exemplo, as ilustrações esquemáticas de duas novas construções de direcionamento (+16 a k e k +12 a Vetor alvos) usado para a inserção progressiva de adição de segmentos de genes humanos hV λ são fornecidos na Figura 5A. Como ilustrado, os adicionais contendo fragmentos do genes específicos dos segmentos de genes humanos hV λ são inseridos no sítio de cadeia leve λ endógeno modificado, em etapas sucessivos usando homologia fornecida pela inserção prévia dos sequências de cadeia leve humanas. Após a recombinação com cada constructo de direcionamento ilustrado, de modo sequencial, 28 segmentos de genes adicionais hV λ são inseridos no sítio de cadeia leve λ endógeno modificado. Isto cria um local quimérico que produz um λ , proteína de cadeia leve que comprehende os segmentos de genes humanos V λ a J λ ligados a um gene de camundongo C λ

[000203] As abordagens acima para inserir os segmentos de gene de cadeia leve λ humanos no camundongo mantém os potenciadores posicionado a jusante dos segmentos de CK2 a J λ 4 a CK4 genes (designados Enh 2.4, Enh Enh e 3,1 figura 4A e Figura 5A). Esta abordagem resulta em um único alelo modificado no sítio de cadeia leve λ de camundongo endógeno (Figura 7A).

[000204] As composições e métodos para a tomada de um camundongo que expressa uma cadeia leve compreendendo hV λ e segmentos de genes J λ operativamente ligados a um segmento de gene de camundongo C λ λ , são fornecidas, incluindo composições e método para fazer um camundongo que expressa a partir de tais genes endógenos de camundongo an λ , sítio de cadeia leve. Os métodos incluem seletivamente fornecendo um camundongo endógeno V k a J λ .

a Cλ gene agrupamento de não a funcionais (por exemplo, por uma deleção alvo), e empregando um hVλ e segmentos de genes Jλ no sítio de cadeia leve λ de camundongo endógeno que expressam um domínio hVλ em um camundongo .

[000205] Em alternativa, em uma segunda abordagem, os segmentos de gene de cadeia humanos leves podem ser posicionados no sítio de cadeia leve K endógeno. A modificação genética, em várias modalidades, compreende uma deleção do sítio de cadeia leve K endógena. Por exemplo, para eliminar as cadeias leves K do camundongo a partir do repertório de anticorpos endógenos uma deleção da VK camundongo e segmentos de genes Jλ podem ser feitas. Embriões de camundongos geneticamente modificados, células e constructos de segmentação para fazer os camundongos, embriões de camundongos e células também são fornecidos.

[000206] Pelas razões expostas acima, a exclusão da VK camundongo e segmentos de genes Jλ emprega uma ruptura relativamente mínima. Uma ilustração esquemática (sem escala) de excluído camundongo VK e segmentos de genes Jλ é fornecida na Figura 3. O camundongo endógeno Vk e segmentos de genes Jλ são eliminados através recombinase mediada exclusão da posição do camundongo entre duas sequências precisamente posicionado vetores de segmentação cada empregando local específicos do local de recombinação. Um primeiro vetor alvo (Vetor alvo plc) é empregado em um primeiro evento visando excluir os segmentos de genes de camundongo Jλ . Um segundo vetor de segmentação (Vetor alvo Vk) é empregado em um segundo evento de direcionamento sequencial de uma sequência localizada a 5' do gene mais distal do segmento VK camundongo. Ambos os vetores contêm sítios alvo específicos do local de recombinação, dessa maneira, permitindo a supressão seletiva de ambos os cassetes de seleção e de todos os intervenientes

camundongo K sequências de cadeia leve, após uma segmentação foram bem sucedidas. O local resultante excluído é funcionalmente silenciado em que nenhuma cadeia leve K endógena pode ser produzido. Este local modificado pode ser utilizado para a inserção de hV λ , e segmentos de genes J λ para criar um Sítio K de camundongo endógeno compreendendo hV λ . e segmentos de genes J λ , em que, após a recombinação no local modificado, o animal produz λ compreendendo cadeias leves hV λ e segmentos de genes rearranjados J λ operativamente ligados a um segmento de gene de camundongo endógeno CK. Vários vetores de segmentação compreendendo as duas sequências de cadeia leve podem ser usados em conjunto com este sítio K excluído de camundongo para criar um sítio de cadeia leve contendo os segmentos do gene híbrido humano λ operativamente ligados a uma região Camundongo Ck.

[000207] Deste modo, as segundas posições de aproximação de um ou mais segmentos de genes humanos V λ são posicionadas no camundongo sítio K de cadeia leve contíguo com um segmento do gene humano J λ única (12/1 a K Vetor alvo, Figura 4B).

[000208] Em várias modalidades, as modificações a esta abordagem podem ser efetuadas para adicionar os segmentos de genes e/ou as sequências reguladoras para otimizar a utilização do sítio K das sequências de cadeia leve λ humana de camundongo dentro do repertório de anticorpos do camundongo.

[000209] Em uma terceira abordagem, um ou mais segmentos de genes hV λ . são posicionados no sítio de cadeia leve K de camundongo contíguo com quatro sequências de genes (hJ λ 12/4 a K Vetor alvo Figura 4B).

[000210] Em uma terceira abordagem, um ou mais segmentos do gene hV λ . estão posicionados no camundongo sítio da cadeia leve K com uma sequência contígua de K humano intergênica e uma

sequência de gene único hJ λ (12001 x a Vetor alvo, Figura 4B).

[000211] Em uma quarta abordagem, um ou mais segmentos do gene hV λ estão posicionados no camundongo sítio de cadeia leve K contíguo com um humano K intergênicas sequência de quatro sequências de genes hJ λ (12004 K a Vetor alvo Figura 4B).

[000212] Todas as abordagens acima para inserir humanos 2 segmentos de gene de cadeia leve no camundongo Sítio K, manter o K intrônica elemento potenciador a montante do gene Cic (Designado EKI, Figura 4B e 5B Figura) E 3' a jusante de K e realçador do gene CK (designado EK3', Figura 4B e Figura 5B). O resultado de quatro abordagens separadas alelos modificados no camundongo endógeno Sítio K de cadeia leve (Figura 7B).

[000213] Em várias configurações, camundongo geneticamente modificado compreendem um nocaute de os endógenos λ do camundongo, sítio da cadeia leve. Em uma modalidade, o λ , sítio de cadeia leve é eliminado através de uma estratégia que exclui a região que abrange a V λ 2 J λ 2, e a região que abrange a vkl CKL (Figura 2). Qualquer estratégia que reduz ou elimina a capacidade do λ endógeno, sítio de cadeia leve de expressar os domínios λ endógenos é adequado para utilização com as modalidades da presente divulgação.

Anticorpos de Domínio Lambda a partir de camundongos geneticamente modificados

[000214] Os camundongos compreendem as sequências humanas λ em ambas o camundongo K quanto a cadeia leve λ expressando um sítio de cadeia leve que compreende uma região hV λ fundida a uma região Camundongo CL (CK ou C λ). Estes são Vantajosamente produzido para camundongos que (a) compreende um sítio de cadeia funcionalmente silenciado luz (por exemplo, um nocaute do camundongo K endógeno ou o sítio de cadeia leve λ), (b) compreende um sítio de cadeia leve de camundongo endógeno λ que compreende

hV e segmentos de genes hJ operativamente ligado a um camundongo endógeno Cλ λ, gene, (c) compreende um Sítio K de camundongo endógeno de cadeia leve que compreende hVλ. e segmentos de genes hJλ operativamente ligados a um gene endógeno do camundongo CK, e, (d) em que um camundongo um alelo K compreende hVλ.s e hJλ s, o alelo K e outro compreendendo hVλs hJλs; uma hVλ s alelo λ compreendendo e hJλ s e um alelo λ silenciados ou eliminados, ou ambos alelos λ compreendendo hVλs e hJλs, e, cadeia pesada de dois alelos que compõem cada hVλ s, hDHs e hJλ s.

[000215] Os anticorpos que compreendem os domínios hVλ expressos no contexto da CK ou Cλ são usados para produzir anticorpos completamente humanos por clonagem dos ácidos nucleicos que codificam para os domínios hVλ em constructos de expressão que carregam os genes que codificam Cλ humano. Os constructos de expressão resultantes são transfetados em células hospedeiras adequadas para a expressão de anticorpos que exibem um domínio totalmente hVλ fundido a HCλ

EXEMPLOS

[000216] Os exemplos seguintes são proporcionados de modo a descrever como preparar e usar os métodos e composições da presente invenção, e não se destinam a limitar o âmbito do que os inventores consideram como a sua invenção. A menos que indicado de outra maneira, a temperatura é indicada em graus Celsius, e pressão é a atmosférica ou próxima.

Exemplo I

Exclusão do sítio de cadeia leve de Imunoglobulina de camundongo

[000217] Diversos constructos de direcionamento foram feitas usando tecnologia VELOCALGENE ® (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 6.586.251 e hVλ lenzuela et al. (2003) High- throughput engineering of the mouse genoma coupled with high-resolution expression analysis,

Nature Biotech. 21 (6) :652 a 659) para modificar cromossomo bacteriano do camundongo de bibliotecas de gene Artificial (BAC) para inativar o sítio K e λ de cadeia leve de camundongo.

Exclusão do sítio λ de cadeia leve camundongo. DNA de camundongo BAC clone RP23 a 135k15 (Invitrogen) foi modificado através de recombinação homóloga para inativar os λ camundongo endógenas, sítio de cadeia leve através da deleção alvo do V κ a J λ , a C λ , agrupamentos de genes (Figura 2).

[000218] Em resumo, todo o agrupamento proximal compreendendo gene VM a R3 a C λ 3 a R1 a C λ 1 segmentos foi suprimido em um único evento alvo utilizando um vetor de direcionamento compreendendo um cassete de neomicina flanqueado por sítios / OXP com um braço 5' homologia camundongo contendo a sequência 5' do segmento de gene V λ .1 e uma 3' do braço de homologia camundongo contendo sequência 3' do C λ λ , um segmento de gene (Figura 2, Vtor alvo 1).

[000219] Um constructo de segundo alvo foi preparado precisamente excluir o distal endógena camundongo conjunto do gene λ contendo V λ ,2 a J λ 2 a C λ 2 a J λ 4 a CK4 exceto que o alvo constructo continha um braço 5' homologia camundongo que continham sequência 5' o segmento de gene V λ 2 e "braço de homologia do camundongo, que continha a sequência 5' a 3 para o segmento de gene endógeno C λ 2 (Figura 2, Vtor alvo 2). Dessa maneira, a segmentação segundo constructo precisamente eliminado V λ 2 a J λ 2, deixando C λ 2 a J λ ,4 a C λ 0,4 intacto no endógena camundongo λ local. As células ES contendo um inactihV λ do endógeno λ local (como descrito acima) foram confirmadas por métodos de rastreio e cariotipagem (por exemplo, TaqMan ®) conhecidos na técnica. O DNA foi depois isolado a partir das células ES modificadas e sujeitas a um tratamento com a enzima Cre recombinase, dessa maneira, mediar a supressão do cassete proximal alvo contendo o gene marcador da neomicina, deixando apenas um sítio

/ OXP no ponto de exclusão (Figura 2, parte inferior).

Exclusão do sítio k de cadeia leve camundongo. Várias construções de direcionamento foram feitas utilizando métodos semelhantes aos descritos acima para modificar o DNA de camundongo clones BAC RP23 a 302g12 e RP23 a 254m04 (Invitrogen) por recombinação homóloga para inativar o camundongo Sítio K de cadeia leve de um processo de duas etapas (Figura 3).

[000220] Resumidamente, os segmentos de genes J λ (1 a 5) do endógena cadeia leve camundongo K lócus foram eliminados em um evento único alvo utilizando um vetor de direcionamento compreendendo uma higromicina timidina a quinase de cassette (hyg a TK), contendo um único / OXP sítio 3' em relação cassette hyg a TK (Figura 3, J λ Vetor alvo). Os braços de homologia utilizados para fazer essa segmentação vetor continha sequência de gene de camundongo a 5' e 3' dos segmentos de genes endógenos de camundongo J λ . Em um segundo evento de segmentação, um segundo vetor de direcionamento foi preparada para excluir uma porção da sequência de gene de camundongo a montante (5') para o camundongo endógeno mais distal segmento de gene V k (Figura 3, VK Vetor alvo). Este vetor continha um local de segmentação invertido / ox511, a / local OXP e um cassette de neomicin λ Os braços de homologia utilizados para fazer essa segmentação vetor sequência de gene de camundongo continha a montante do segmento do gene mais distal do camundongo V k . Os vetores alvo foram utilizados de uma forma sequencial (isto é, em seguida, V k J $\lambda\lambda$) para alvejar DNA em células ES. ES tendo um cromossoma de duplo a alvo (isto é, um único camundongo endógeno Sítio K alvo, com ambos os vetores de segmentação) foram confirmadas por métodos de rastreio e cariotipagem (por exemplo, TaqmanTm) conhecidos na técnica. O DNA foi depois isolado a partir das células ES modificadas e sujeitas a um tratamento com a enzima Cre recombinase,

dessa maneira, mediar a eliminação de segmentos de VK de camundongo endógenas de genes e ambos os cassetes de seleção, enquanto deixando dois local lox justapostos em orientação oposta em relação ao outro (figura 3, parte inferior, SEQ ID NO: 1).

[000221] Deste modo, dois locais modificados endógenos em cadeia leve (Ic e λ) contendo intacto regiões do promotor e constante foram criados para progressivamente a inserção não rearranjados 2 humana λ . segmentos de genes da linhagem germinativa de um modo preciso usando vetores alvo descrita abaixo.

Exemplo II

Substituição de sítio de cadeia leve de camundongo com um mini-sítio de cadeia leve λ Humano

[000222] Vários vetores de segmentação foram projetados para a inserção progressiva de k humana segmentos de genes endógenos de camundongo para as K e λ sítio de cadeia leve, utilizando métodos semelhantes aos descritos acima λ Múltiplos e independentes modificações iniciais foram feitas para o sítio de cadeia leve endógenos produzindo cada um sítio de cadeia leve químérica contendo $\text{hV}\lambda$ e segmentos de genes $\text{J}\lambda$ operativamente ligados a genes de cadeia leve constante de camundongo e potenciadores.

Um mini-sítio λ . humana contendo 12 $\text{V}\lambda$ humano e um segmento de gene $\text{J}..$ humano.

[000223] Uma série de vetores de segmentação iniciais foram desenhadas para conter os primeiros 12 consecutivos segmentos dos genes humanos da $\text{V}\lambda$ Um aglomerado e um segmento de gene $\text{hJ}\lambda$ 1 ou quatro segmentos de genes $\text{hJ}\lambda$ usando um clone BAC humano chamado RP11 a 729g4 (Invitrogen). As FIGs. 4A e 4B mostram os vetores de segmentação, que foram construídos para fazer uma inserção inicial de humanos leves λ segmentos de gene de cadeia λ no camundongo e sítio de cadeia leve λ λ , respectivamente.

[000224] Durante um primeiro conjunto de vetores iniciais de direcionamento, um fragmento de DNA por 124.125 da 729g4 clone BAC contendo 12 segmentos de gene hVλ. e um segmento de gene hJλ 1 foi modificado para conter um local de PI a SCEL 996 por a jusante (3') do hJ7, um segmento de gene para ligação de uma 3' do braço homologia camundongo. Dois diferentes conjuntos de braços de homologia foram utilizados para a ligação a este fragmento humano, um conjunto de braços de homologia de camundongo continha sequências endógenas λ a partir do clone BAC 135k15 (Figura4A) e outro conjunto continha sequência endógena K 5' e 3' do camundongo e segmentos de genes VK Jλ de camundongo clones BAC RP23 a 302g12 e RP23 a 254m04, respectivamente (Figura 4B).

[000225] Para a 12/1 a λ , Vetor alvo (Figura 4A), um local PI a SCEL foi projetado na Extremidade 5' de um fragmento de DNA de 27847 contendo o camundongo CK2 a Jλ ,4 a CK4 e potenciador 2.4 do camundongo modificado λ , local descrito no Exemplo 1. O fragmento a 28 kb camundongo foi utilizado como um 3' do braço de homologia por ligação ao fragmento humano kb a 124 λ , o que criou uma 3' junção contendo, de 5' para 3', um segmento de gene hJλ .1, 996 por de sequência λ humano a 3' do segmento de gene h .. 1k1, 1229 por sequência de camundongo λ 5' do gene do camundongo Cλ2, o gene de camundongo CK2 e a parte restante do fragmento de camundongo a 28 kb. A montante (5') a partir do segmento humano VK3 a 12 era um gene adicional de 1456 de uma sequência de humano, antes do início da extremidade 5' do braço de homologia do camundongo, que continha 23.792 por de DNA do gene de camundongo correspondente à sequência 5' do camundongo endógeno λ local. Entre a extremidade 5' do braço de homologia e o início da sequência de λ humana era um cassette neomicina flanqueada por local DRF.

[000226] Dessa maneira, um Vetor alvo 12/1 a λ . incluiu, a partir de

5' para 3', 5' do braço de homologia contendo a 24 kb de camundongo λ sequência de gene 5' do local de λ endógeno, um local 5' Frt, um cassete de neomicina, um 3' local DRF, a 123 kb de sequência de gene humana contendo o hV λ 12 primeiro consecutivo, os segmentos de gene e um gene hJ λ .1 segmento, um local PI a SCEL, e um "braço de homologia contendo a 28 kb de sequência de gene do camundongo incluindo os endógenos CK2 a J λ segmentos,4 a CM de genes, o camundongo potenciador 2,4 sequência e adicionais a jusante do camundongo de genes sequência (3' 3) do intensificador de 2,4 (Figura 4A).

[000227] Em uma forma similar, o Vetor alvo 12/1 a x (Figura 4B) utilizou a mesma a 124 λ humanos, fragmentos com a exceção de que os braços de homologia de camundongo contendo camundongo sequência K foram usadas de tal modo que o direcionamento para o local endógeno K pode ser alcançado através de recombinação homóloga. Dessa maneira, o vetor 12/1 a x Targeting incluído, a partir de 5' para 3', um "braço de homologia contendo a 23 kb de sequência de gene de camundongo 5' 5 do endógeno Sítio K, um local de I a Ceul, um local 5' Frt, um cassete de neomicina, um ' local DRF, a 124 kb de sequência humana λ do gene contendo o hV λ 12 primeiro consecutivo, segmentos de gene e um segmento de gene NM, um local de PI a SCEL, e uma 3' 3 braço de homologia contendo a 28 kb de sequência de gene de camundongo, incluindo a endógeno do gene Camundongo Ck, Exi e Ex3' e outras sequências de genes de camundongo a jusante (3') de EK3' (Figura 4B, 12/1 a K Vetor alvo).

[000228] A recombinação homóloga com qualquer destes dois vetores iniciais de segmentação criada uma modificação da cadeia leve de camundongo local (1 (ou λ) contendo 12 hV λ . segmentos de genes e um segmento de gene hJ λ .1 operativamente ligado ao gene camundongo endógeno cadeia leve constante e potenciadores (CK ou

Cλ2 e Eki/Ek3' ou 2,4 Enh / Enh 3.1) do gene que, após recombinação, leva à formação de uma cadeia quimérica leve λ .

Um mini-sítio λ . humano contendo 12 Vλ humano e quatro segmentos de gene J .. humano..

[000229] Em uma outra abordagem para adicionar diversidade para um sítio de cadeia leve quimérica λ , um vetor inicial de tiro na terceira foi projetado para introduzir o primeiro 12 V consecutivo humano λ . a partir de segmentos do gene agrupamento A e hJλ 1, 2, 3 e 7 segmentos de genes para o camundongo sítio de cadeia leve K (Figura 4B, 12/4 a x Vetor alvo). Um segmento de DNA contendo hJλ , 1, Jλ 2, Jλ , 3 e Jλ .7 segmentos de genes foi feita por síntese de DNA novo (Integrated DNA Technologies), incluindo cada um Jλ . segmento de gene e a sequência de gene humana de a 100 por tanto o imediato 5' e 3' de cada segmento de regiões de genes Jλ . Um local de PI a SCEL foi concebido para o terminal 3' do fragmento de DNA da presente a 1 kb e ligou a se a um cassete chloroamphenicol. Braços de homologia foram amplificados por PCR a partir de humanos λ , sequência a 5' e 3' em relação à posição do segmento de gene hJλ 1 do clone BAC humano 729g4. A recombinação homóloga com esse vetor intermediário alvo foi realizada em um clone BAC 729g4 modificado que tinha sido previamente orientadas a montante (5') do segmento de V λ 3 a 12 humana com um cassete de gene neomicina flanqueado por local FRT, que também continha um local de I a Ceul a 5' do local 5' Frt. A double a alvo 729g4 clone BAC incluído a partir de 5' para 3', um local de I a Ceul, um local 5' Frt, um cassete de neomicina, um 3' local DRF, um fragmento de a 123 kb contendo 12 segmentos de genes hVλ, um fragmento contendo a 1 kb humano Jλ 1, 2, 3 e 7 segmentos de genes, um local PI a SCEL, e um cassete chloroamphenicol. Este vetor intermediário foi digerido alvo juntamente com I a Ceul e PI a SCEL e subsequentemente ligado no camundongo modificado clone BAC

(descrito acima) para criar o terceiro vetor de segmentação.

[000230] Esta ligação resultou em um terceiro vetor de direcionamento para a inserção de X humanos, sequências endógenas na sítio de cadeia leve K, que inclui, a partir de 5' para 3', 5' do braço de homologia camundongo contendo a 23 kb de sequência de gene a 5' do camundongo endógeno Sítio K, um local de I a Ceul, um 5' Frt local, um cassete de neomicina, um 3' local DRF, um fragmento de a 123 kb contendo o hVλ primeiro 12, segmentos de gene, um fragmento de kb que contém hJλ a 1, 1, 2, 3 e 7 segmentos de genes, um local de PI a SCEL e um "braço de homologia contendo a 28 kb de sequência de gene de camundongo, incluindo a endógeno do gene Camundongo Ck, e Eki EK3' 3 e adicionais a jusante da sequência de gene de camundongo (3') de EK3' (Figura 4B, 12/4 a K Vetor alvo). Recombinação homóloga com este terceiro vetor alvo criou um camundongo modificado Sítio K da cadeia leve contendo 12 segmentos hVλ genes e quatro hJλ . segmentos de genes operativamente ligado ao gene endógeno de camundongo de CK, que, após a recombinação, leva à formação de um ser humano químérico λ camundongo / cadeia K leve.

Um mini-sítio λ . humana com uma sequência de cadeia leve k humana integrada.

[000231] De um modo semelhante, dois vetores de segmentação adicionais semelhantes aos concebidos para fazer uma inserção inicial de segmentos de genes humanos para o λ endógeno sítio de cadeia leve K (Figura 4B, 12/1 a K e Vetores 12/4 a K Targeting) foram projetado para inserir progressivamente humanos luz λ segmentos da cadeia de genes usando exclusivamente construído visando vetores contendo contíguos λ humanos e sequências de genes K. Estes vetores foram construídos de segmentação para incluir um a 23 kb de sequência de gene humana K naturalmente localizado entre os segmentos de genes humanos Vκ 4 a 1 e Jλ 1. Esta sequência de gene

humana K foi especificamente posicionados nestes dois vetores adicionais segmentação entre V2 humano, e Jλ humano, segmentos de gene (Figura 4B, 12 (K) e 1 a K 12 (K) 4 a K Vetor alvoes).

[000232] Ambos os vetores que contêm a sequência alvo do genoma humano K foram feitas usando o método modificado RP11 a 729g4 clone BAC descritas acima (figura 6). Esta modificação BAC clone foi alvejado com um cassete de seleção espechinomicina ladeado por NotI e sítios de restrição AsiSI (figura6 esquerda, em cima). A recombinação homóloga com cassete de espechinomicina resultou em um estudo duplo a alvo clone BAC 729g4 que inclui, a partir de 5' para 3', um local de I a Ceul, um local 5' Frt, um cassete de neomicina, um 3' local DRF, um a 123 kb fragmento contendo os primeiros 12 segmentos de gene hVλ., um local NotI a cerca de 200 por a jusante (3') com a sequência do segmento nonâmero hVλ.3 a 1 gene, um cassete de espechinomicina e um local AsiSI. Um separado clone BAC humano contendo a sequência de K humano (CTD a 2366j12) foi alvejado duas vezes independentes para projetar local de restrição em localizações entre hVλ.4 a 1 e hJλ 1 segmentos de genes para permitir a subsequente clonagem de um fragmento de a 23 kb para a ligação com o hVλsegmentos de genes contidos no duplo alvo modificado 729g4 BAC clone (Figura 6, à direita).

[000233] Em resumo, o clone BAC 2366j12 é de cerca de 132 kb em tamanho e que contém segmentos de genes hVλ. 1 a 6, 1 a 5, 2 a 4, 7 a 3, 5 a 2, 4 a 1, a sequência de gene humana K jusante dos segmentos de genes VK, segmentos de genes hJλ 1 a 5, o Hck e cerca de 20 kb de sequência de gene adicional do sítio K humano. Este clone foi inicialmente alvo de um vetor de direcionamento que contém um cassete de higromicina flanqueada por local DRF e um local NotI a jusante (3') da extremidade 3' local Frt. Os braços de homologia de sequência alvo presente vetor continha do gene humano 5' e 3' dos

segmentos de genes VK no clone BAC tal que, após a recombinação homóloga com esse vetor alvo, os segmentos de genes VK foram eliminados e um sítio NotI foi manipulado por a 133 a jusante do segmento de gene hVλ.4 a 1 (Figura 6, à direita). Esta modificação 2366j12 clone BAC foi alvo independentemente com dois segmentação vetores na extremidade 3' para eliminar os segmentos Hj a K com um cassete do gene chloroamphenicol que também continha ou um hJλ segmento do gene 1, um local de PI a SCEL e um local AsiSI ou de um fragmento do gene humano contendo quatro segmentos do gene hJλ (supra), um local PI a SCEL e um local AsiSI (figura 6, à direita). Os braços de homologia para estes dois vetores semelhantes segmentação continha a sequência 5' e 3' dos segmentos de genes hJλ . A recombinação homóloga com estes vetores segundo a segmentação e modificado 2366j12 BAC clone produziu um clone de duplo a alvo 2366j12 que inclui, a partir de 5' para 3', um ' local DRF, um cassete de higromicina, a 3' 5 Frt local, um local NotI, 22800 por um fragmento do gene do sítio K humana contendo a região intergênica entre o V λ 4 a 1 e os segmentos do gene de JO, ou um segmento de gene hJλ 1 ou um ser humano λ fragmento do gene contendo hJλ 1, JA2, Jλ 3 e Jλ 7, um local PI a SCEL e um cassete chloroamphenicol (figura 6, à direita). Dois vetores finais de segmentação para fazer as duas modificações adicionais foram realizados por duas etapas laqueadura com os clones de duplo alvo 729g4 e 2366j12.

[000234] Os clones duplos alvo 729g4 e 2366j12 foram digeridos com NotI e AsiSI produzindo um fragmento que contém cassete de neomicina e segmentos de genes hVλ. e outro fragmento que contém o fragmento do gene a 23 kb do sítio K humana contendo a região intergênica entre o VK4 a 1 e do gene JO segmentos, ou um segmento de gene hal ou um fragmento do gene contendo hJλ 1, Jλ 2, Jλ 3 Jλ 7 e segmentos de genes, o PI -SCEL local e cassete chloroamphenicol,

respectivamente. Ligadura destes fragmentos gerou dois clones BAC que contêm únicas de 5' para 3' a hVλ, Segmentos de genes, a sequência de gene humana K entre o Vk 4 a 1 e os segmentos do gene de JO, ou um hJλ. Um segmento de gene ou de um fragmento do gene contendo hJλ .1, Jλ 2, Jλ 3 e Jλ 7 segmentos de genes, um local de PI a SCEL e um cassete chloroamphenicol (Figura 6, em baixo). Estes novos clones BAC foram então digeridos com 1 a Ceul e PI a SCEL para libertar os fragmentos únicos contendo cassete de neomicina a montante e as sequências contíguas humanos λ e K e ligado em um BAC camundongo modificado 302g12 clone que continha a partir de 5' para 3' sequência de gene de camundongo a 5' da endógeno Sítio K, um local de I a Ceul, um local 5' Frt, um cassete de neomicina, um local DRF 3', segmentos de genes hVλ. (3 a 12 a 3 a 1), um local NotI a 200 por a jusante de VK3 a 1, a 23 Kb de sequência K humano naturalmente encontrada entre o humano Vk 4 a 1 e segmentos de gene Jo, ou um segmento de gene hJλ 1 ou um fragmento do genoma que contém hJλ 1, Jλ 2, Jλ 3 e Jλ 7 segmentos de gene, o Exi camundongo, o gene do camundongo Ck e EK3' (Figura 4, 12hV2, a Vidic a hJλ 1 e 12hVλ. a VKJλ a 4hJλ Vetor alvoes). A recombinação homóloga com ambos estes vetores de segmentação criados dois separados modificados camundongo Sítio K de cadeia leve contendo 12 segmentos de gene, sequência hVλ. K do gene humano, e qualquer um dos dois ou quatro hJλ segmentos do gene operativamente ligado ao gene endógeno de camundongo de CK, que, após a recombinação, leva à formação de uma cadeia leve k humana/ camundongo quimérica.

Exemplo III

Engenharia adicional de Segmentos de Genes Vλ Humanos Em um Mini-sítio de cadeia leve λ humana

[000235] Os segmentos de genes adicionais hVλ foram adicionados de forma independente para cada uma das modificações iniciais descritas

no Exemplo 2, utilizando vetores semelhantes alvos e dos métodos (Figura 5A, +16 a k Vetor alvo e Figura 5B, Vetor K +16 a de segmentação).

[000236] A introdução de 16 segmentos adicionais de genes humanos V_k. Braços a montante (5') homologia utilizado no constructo de vetores de segmentação para a adição de 16 hV_λ adicional λ . segmentos de genes para o sítio de cadeia leve modificados descritos no Exemplo 2 da sequência de gene de camundongo continha 5', quer do K endógena ou sítio de cadeia λ de luz. A 3' braços de homologia foram as mesmas para todos os vetores e sequências alvo do gene humano contido sobrepostas com a extremidade 5' do λ humana, a sequência das modificações, tal como descrito no Exemplo 2.

[000237] Em resumo, dois vetores de segmentação foram projetados para a introdução de mais 16 hV_λ, segmentos de genes modificados para as sítio de cadeia leve de camundongo descritas no Exemplo 2 (Figura 5A e 5B, +16 a λ ou +16 a x Vetor alvo). Um fragmento de DNA de a 172 kb a partir de humano BAC clone RP11 a 761113 (Invitrogen) contendo 21 segmentos de gene consecutivos hV_λ de aglomerado A foi fabricado de acordo com um braço 5' que contém homologia de sequência de gene de camundongo a 5', quer ao K endógena ou λ , sítio de cadeia leve e um braço 3' contendo homologia de sequência de gene humana λ . A 5' braços camundongo K ou k de homologia utilizados nestas constructos de direcionamento fosse o mesmo 5' braços de homologia descritas no Exemplo 2 (Figura 5A e 5B). A 3' do braço de homologia incluía um 53.057 por sobreposição de sequência humana λ do gene correspondentes ao equihV_λ lente 5' terminal do fragmento a 123 kb de sequência de gene humana λ descrito no Exemplo 2. Estes dois vetores de segmentação incluída, a partir de 5' para 3', 5' do braço de homologia camundongo contendo quer a 23 kb de sequência de gene a 5' do camundongo endógeno

Sítio K de cadeia leve ou a 24 kb de sequência de gene de camundongo a 5' da endógeno λ , sítio da cadeia leve, a 5' local Frt, um cassete higromicina, um 3' local Frt e 171.457 pelo de sequência de gene humana k contendo 21 hV consecutiv λ λ segmentos de genes, de a 53 kb, que se sobrepõe à extremidade 5' do λ humana, a sequência descrita no Exemplo 3 e serve como a 3' do braço de homologia para esto constructo de direcionamento (Figura 5A e 5B, +16 a λ ' . or +16 a K Segmentação Vetores). Recombinação homóloga com esses vetores de segmentação criada independentemente do camundongo modificado K e sítio de cadeia leve cada hV λ 28 contém segmentos de gene e um segmento de gene operativamente hJ λ .1 ligados a genes de camundongo endógenas constantes (ou CK CK2), que, após a recombinação, leva à formação de uma cadeia leve quiméric λ [000238] Em uma forma similar, o vetor K +16 a Targeting foi também usado para introduzir o 16 adicionais hV λ segmentos de genes para as outras modificações iniciais descritas no Exemplo 2, que incorporou segmentos de genes múltiplos hJ λ com e sem uma sequência integrada de K humano (Figura 4B). A recombinação homóloga com esse vetor alvo no local de camundongo endógeno K contendo as outras modificações iniciais criadas camundongo Sítio K de cadeia leve contendo 28 segmentos de genes e hV λ hJ λ 1, 2, 3 e 7 segmentos de genes, com e sem uma sequência de gene humana V k a J k ligada operativamente para o gene endógeno de camundongo de CK, que, após a recombinação, leva à formação de uma cadeia leve quimérica de k a ic. [00241] A introdução de 12 segmentos de genes humanos adicionais V λ . Segmentos de genes adicionais hV λ foram adicionados de forma independente para cada uma das modificações acima descritas utilizando vetores semelhantes alvos e dos métodos. A estrutura lócus final resultante da recombinação homóloga com a segmentação vetores contendo os segmentos de genes adicionais hV λ .

são mostrados na Figura 7A e 7B.

[000239] Em resumo, um vetor alvo foi projetado para a introdução de 12 hVλadicional segmentos de gene para o K camundongo modificado e λ sítio de cadeia leve descrito acima (Figura 5A e 5B, +12 a λ ou 12 a K Vetor alvoes). A 93.674 por fragmento de DNA de humano BAC clone RP11 a 22118 (Invitrogen) contendo 12 segmentos de genes consecutivos hVλdo agrupamento B foi projetada com um braço 5' homologia contendo sequência de gene do camundongo 5', quer ao K camundongo endógena ou λ luz sítio de cadeia e um braço 3' contendo homologia de sequência de gene humana k. A 5' braços de homologia utilizados neste constructo de direcionamento fosse o mesmo 5' braços de homologia utilizados para a adição de 16 hVλsegmentos de genes acima descritos, (Figura 5A e 5B). A 3' do braço de homologia foi feita por engenharia um local PI a SCEL a 3431 por 5' do segmento de gene humano Vλ 3 a 29P contido em um fragmento de 27468 por do gene de humano λ sequência do BAC clone RP11 a 761I13. Este local PI a SCEL serviu como um ponto de ligação para juntar o fragmento a 94 kb de sequência adicional k humana ao fragmento de a 27 kb de sequência λ humano que se sobrepõe com a extremidade 5' da sequência λ humano na modificação anterior, utilizando o +16 a λ . ou +16 a x Vetor alvoes (Figura 5A e 5B). Estes dois vetores de segmentação incluída, a partir de 5' para 3', um "braço de homologia contendo quer a 23 kb de sequência de gene de camundongo 5' 5 do endógeno sítio de cadeia leve K ou a 24 kb de sequência de gene de camundongo a 5' da endógeno λ sítio de cadeia leve, um local 5' Frt, um cassete de neomicina, um 3' local DRF e por 121.188 de do gene humano λ sequência contendo 16 segmentos de gene hVλ. e um local de PI a SCEL, a 27 kb de que se sobrepõe com a extremidade 5' do λ humana, a sequência da inserção de 16 segmentos de gene de adição hVλ. e serve como a 3' braço de homologia para esto constructo de

direcionamento (Figura 5A e 5B, +12 a k ou 12 a K Vetor alvoes). Recombinação homóloga com esses vetores de segmentação criados independentemente modificada do camundongo e K λ sítio de cadeia leve contendo 40 segmentos do gene J e hVλ. humano λ 0,1 operativamente ligados a genes de camundongo endógenas constantes (CI (ou Cλ 0,2) que, após recombinação, leva à formação de uma cadeia leve quimérica (parte inferior da figura 5A e 5B).

[000240] Em uma forma similar, o vetor x +12 a Targeting foi também usado para introduzir 12 segmentos de gene hVλ. adicionais para as outras modificações iniciais que incorpora hVλ em vários segmentos do gene hJλ com e sem uma sequência integrada de K humano (Figura 4B). A recombinação homóloga com esse vetor alvo no local de camundongo endógeno K contendo as outras modificações criado um camundongo Sítio K de cadeia leve contendo 40 segmentos de genes e hVλ. hJλ 1, 2, 3 e 7 segmentos de genes, com e sem uma sequência de Vκ a Jκ de gene humana ligado operacionalmente para o gene endógeno de camundongo de CK, que, após a recombinação, leva à formação de um k quimérico a ic cadeia leve.

Exemplo IV

Identificação de células ES alvo suportando os segmentos de gene de cadeia leve λ humanos

[000241] BAC de DNA alvo feito de acordo com os Exemplos anteriores foi utilizado para electroporate células ES de camundongo para criar as células ES modificadas para gerar camundongos quiméricos humano que expressam λ segmentos de gene de cadeia leve. As células ES contendo uma inserção de segmentos de gene de cadeia leve não rearranjado humana foram identificados por um ensaio quantitativo de TaqMan ®. Conjuntos específicos de primers e sondas foram desenhados para a inserção do ser humano λ sequências e cassetes de seleção associados (ganho de alelo, GOA), perda de

sequências do camundongo endógenos e quaisquer cassetes de seleção (perda de alelo, LOA) e retenção de sequências de acompanhamento do camundongo (retenção de alelo, AR). Para cada inserção adicional de duas sequências humanas, conjuntos de iniciadores e sondas adicionais foram utilizados para confirmar a presença das sequências adicionais λ humano, assim como os conjuntos de iniciadores e sondas anteriores utilizadas para confirmar a retenção das sequências previamente marcadas humanas. A Tabela 1 apresenta os primers e sondas associadas utilizados nos ensaios de PCR quantitativa. A Tabela 2 apresenta as combinações utilizadas para confirmar a inserção de cada seção do ser humano λ segmentos de gene de cadeia leve em clones de células ES.

[000242] As células ES que ostentam os humanos k segmentos de gene de cadeia leve são opcionalmente transfetadas com um constructo que expressa FLP, a fim de remover cassette de neomicina Frfed introduzido pela inserção do constructo de direcionamento que contém segmentos de genes humano VK5 a 52 a Vk1 a 40 (Figura 5A e 5B). Cassete da neomicina pode ser opcionalmente removido por meio de cruzamento para camundongos que expressam a recombinase FLP (por exemplo, EUA 6.774.279). Opcionalmente, o cassette da neomicina é retido nos camundongos.

Tabela 1

Modificação	Ensaio	Conjunto de iniciador Reverso/dianteiro	Probe	Localização da sequência
Inserção de 12 hVλ & hJλ1	GOA	hL2F/hL2R	hL2P	hVI3-12 – hVI3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		61hJ1F/61hJ1R	61hJ1P	Sequência hJ1
		NeoF/NeoR	NeoP	cassete de Neomicina
	LOA	MK2OF/MKP4R	—	sequência lox511/loxP

Modificação	Ensaio	Conjunto iniciador Reverso/dianteiro	Probe	Localização da sequência
Inserção de 16 hVλ				de sítio K inativado
		HygF/HygR	HygP	Cassete de higromicina a partir de local I inativado
		mL1F/mL1R	mL1P	Agrupamento de camundongo VI1-Cl1
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Agrupamento de camundongo VI2-Cl2
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Sequência de camundongo no local 5' Vκ
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Sequência de camundongo no local 3' Vκ
	GOA	67hT1F/67hT1R	67hT1P	hVλ3-27 -
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	hVλ3-12
		HygF/HygR	HygP	Cassete de Higromicina
	LOA	NeoF/NeoR	NeoP	cassete de Neomicina
		mL1F/mL1R	mL1P	Agrupamento de camundongo Vλ1-Cλ1
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Agrupamento de camundongo Vλ2-Cλ2
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR/ LOA	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12 -
		hL3F/hL3R	hL3P	hVλ3-1
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Sequência de camundongo no local 5' Vκ
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Sequência de camundongo no local 3' Vκ

Modificação	Ensaio	Conjunto de iniciador Reverso/dianteiro	Probe	Localização da sequência
Inserção de 12 hVλ	GOA	68h2F/68h2R	68h2P	hVλ5-52 —
		68h5F/68h5R	68h5P	hVλ1-40
		NeoF/NeoR	NeoP	cassete de Neomicina
	LOA	HygF/HygR	HygP	Cassete de Higromicina
		mL1F/mL1R	mL1P	Agrupamento de camundongo Vλ1-Cλ1
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Agrupamento de camundongo Vλ2-Cλ2
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12 —
		hL3F/hL3R	hL3P	hVλ3-1
		67hT1F/67hT1R	67hT1P	hVκ3-27 —
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	hVλ3-12
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Sequência de camundongo no local 5' Vκ
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Sequência de camundongo no 3' Vκ

Tabela 2

Modificação	Ensaio	Conjunto de iniciador Reverso/dianteiro	Probe	Localização da sequência
Inserção de 12 hVκ & hJλ1	GOA	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12 — hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		61hJ1F/61hJ1R	61hJ1P	Sequência hJλ
		NeoF/NeoR	NeoP	cassete de Neomicina
	LOA	MK2OF/MKP4R	—	sequência lox511/loxP de local κ inativado

Modificação	Ensaio	Conjunto de iniciador Reverso/dianteiro	Probe	Localização da sequência
Inserção de 16 hV _k		HygF/HygR	HygP	Cassete de higromicina a partir de local λ inativado
		mL1F/mL1R	mL1P	Agrupamento de camundongo V λ 1-C λ 1
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Agrupamento de camundongo V λ 2-C λ 2
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Sequência de camundongo no local 5' V κ
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Sequência de camundongoin no local 3' V κ
	GOA	67hT1F/67hT1R	67hT1P	hV λ 3-27 – hV κ 3-12
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	
		HygF/HygR	HygP	Cassete de Higromicina
	LOA	NeoF/NeoR	NeoP	cassette de Neomicina
		mL1F/mL1R	mL1P	Agrupamento de camundongo V κ 1-C κ 1
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Agrupamento de camundongo V λ 2-C λ 2
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hV κ 3-12 – hV κ 3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Sequência de camundongo

Modificação	Ensaio	Conjunto de iniciador Reverso/dianteiro	Probe	Localização da sequência
				no local 5' VK
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Sequência de camundongoi no local 3' VK
Inserção de 12 hV _k	GOA	68h2F/68h2R	68h2P	hV _k 5-52 —
		68h5F/68h5R	68h5P	hV _k 1-40
		NeoF/NeoR	NeoP	cassette de Neomicina
	LOA	HygF/HygR	HygP	Cassete de Higromicina
		mL1F/mL1R	mL1P	Agrupamento de camundongo V _k 1-C?1
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Agrupamento de camundongo V _k 2-C _k 2
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hV _k 3-12 —
		hL3F/hL3R	hL3P	hV _k 3-1
		67hT1F/67hT1R	67hT1P	hV _k 3-27 —
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	hV _k 3-12
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Sequência de camundongo no local 5' Vic
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Sequência de camundongo no 3' Vic

Exemplo V

Geração de camundongos Expressando as Cadeias Leves λ Humanas A partir de um sítio de cadeias Leves endógeno

[000243] As células ES alvo acima descritos foram utilizadas como células ES doadoras e introduziu- se um embrião de camundongo com

8 células etapa pelo método VELOCALCAMUNDONGO ® (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 7.294.754 e Poueymirou et al. (2007) geração FO camundongos que são, essencialmente, totalmente derivadas das células doadoras gene a alvo ES permitindo imediata fenotípica análises Nature Biotech. 25 (1) :91 a 99. VELOCALMICE ® (camundongos FO totalmente derivados da célula doadora ES) de forma independente tendo segmentos de genes humanos foram k identificado por genotipagem utilizando uma modificação do ensaio de alelo (hVλ Ienzuela et al., supra) que detectou a presença dos humanos únicos segmentos λ gene (supra).

Uso de cadeia leve k : λ de camundongos suportando os segmentos de genes de cadeia leve λ humanos .

[000244] Camundongos homozigóticos para cada uma das três inserções de sucessivos segmentos de genes hVλ com um único segmento de gene hJλ (Figura 5B) e camundongos homozigóticos para uma primeira inserção de segmentos de genes hVλ. com qualquer segmento de um gene ou hJλ quatro segmentos de genes humanos, incluindo um humano Jλ Vκ a jic sequência de gene (Figura 4B) foram analisadas para K e λ expressão de cadeia leve de esplenócitos utilizando citometria de fluxo.

[000245] Em resumo, os baços foram colhidos a partir de grupos de camundongos (Variando entre três e sete animais por grupo) e moídas utilizando lâminas de vidro. Seguindo a lise de glóbulos vermelhos (RBC) com tampão de lise ACK (Lonza Walkersville), os esplenócitos foram corados com anticorpos fluorescentes conjugados de corantes específicos para camundongo CD19 (Clone 1D3; BD Biosciences), camundongo CD3 (17A2; Biolegend), camundongo IgG (187,1; BD Biosciences) e camundongo IgK (RML a 42; Biolegend). Os dados foram adquiridos utilizando uma BDTM LSR II citómetro de fluxo (BD Biosciences) e analisados utilizando software FLOWJOTM (Tree Star,

Inc.). A Tabela 3 apresenta os hVλ lores percentuais médios de células B (CD19 +), K da cadeia leve (CD19 + 1 gx IgkTh e λ Cadeia leve (CD19 + Igicigk) expressão observado em esplenócitos de grupos de animais com cada modificação genética λ

[000246] Em uma experiência semelhante, o conteúdo de células B do baço de camundongos compartimento homozigóticos para uma primeira inserção de 12 hVλ. e quatro segmentos de genes hJλ incluindo uma sequência de gene humana Vκ a Jκ operativamente ligado ao gene de camundongo CK (parte inferior da figura 4B) e os camundongos homozigotos para 40 hVλ. e um segmento de gene hJλ (parte inferior da figura 5B ou superior da Figura 7B) foram analisadas quanto à expressão e IGλ IGK utilizando citometria de fluxo (como descrito acima). Figura 8A mostra a expressão e IGK IGIC em células B CD19 + de um camundongo representativo de cada grupo. O número de células CD19 + B por células de baço foi também registada para cada camundongo (Figura 8B).

[000247] Em outra experiência, o conteúdo das células B do baço e medula óssea compartimentos de camundongos homozigóticos, por 40 hVλ. e quatro segmentos de genes hJλ incluindo uma sequência de gene humana Vκ a Jκ operativamente ligado ao gene de camundongo CK (parte inferior da figura 7B) foram analisados para a progressão através do desenvolvimento de células B por citometria de fluxo de superfície celular várias marcadores.

[000248] Em resumo, dois grupos (N = 3 cada, 9 a 12 semanas de idade, do sexo masculino e feminino) do tipo selvagem e os camundongos homozigóticos para 40 hVλ. e quatro segmentos de genes hJλ incluindo uma sequência de gene humana Vκ a Jκ operativamente ligado ao gene de camundongo CK foram sacrificados e os baços e da medula óssea foram colhidas. A medula óssea foi recolhida a partir de fêmures através de lâmina gem com meio RPMI

completo (meio RPMI suplementado com soro fetal de vitelo, piruhVλ to de sódio, Hepes, 2 a mercaptoetanol, não a aminoácidos essenciais, e gentamicina). RBCs de baço e de preparações de medula óssea foram lisadas com tampão de lise ACK (Lonza Walkersville), seguido de lahVλ gem com meio RPMI completo. 1x10⁶ células foram incubadas com anticorpo anti-camundongo CD16/CD32 (2.4G2, BD Biosciences) em gelo durante 10 minutos, seguido de marcação com um painel de anticorpos selecionado por 30 min em gelo.

[000249] painel de medula óssea: anti-camundongo FITC a CD43 (1B11, BioLegend), PE a c a kit (2B8, BioLegend), PeCy7 a IgM (11/41, eBioscience), PerCP a Cy5.5 a IgD (11 a 26c.2a, BioLegend), a APC a B220 (RA3 a 6B2, eBioscience), a APC a H7 a CD19 (ID3, BD) e Pacific Blue a CD3 (17A2, BioLegend).

[000250] A medula óssea e baço: anti-camundongo FITC a Igλ (187.1, BD), PE a Ig λ . (RML a 42, BioLegend), PeCy7 a IgM (11/41, eBioscience), PerCP a Cy5.5 a IgD (11 a 26c.2a, BioLegend), Pacific Blue a CD3 (17A2, BioLegend), a APC a B220 (RA3 a 6B2, eBioscience), a APC a H7 a CD19 (ID3, BD).

[000251] A seguir a coloração, as células foram lahVλ das e fixadas em solução de formalina a 2 %. Dados aquisição foi efectuada em um citómetro de fluxo FACSCANTOITM (BD Biosciences) e analisados com o software FLOWJOTM (Tree Star, Inc.). As FIGs. 9A a 9D mostram os resultados para o compartimento do baço de um camundongo representativo de cada grupo. As FIGs. 10A a 10E mostram os resultados para o compartimento da medula óssea de um camundongo representativo de cada grupo. A Tabela 4 apresenta os hVλ lores percentuais médios de células B (CD19 +), K da cadeia leve (CD19 + IgIg2T), e λ , de cadeia leve (CD19 + IgIg2T +) expressão observado em esplenócitos de grupos de animais com várias modificações genéticas. A Tabela 5 apresenta os hVλ lores percentuais médios de células B (CD194),

células B maduras (B220hilgM +), células B imaturas (B220IntlgM +), células B imaturas expressam K cadeia leve (B220intlgM + IGIC +) e células B imaturas expressam λ cadeia leve (IG λ B220intlgM +, +) na medula óssea de tipo selvagem e camundongos homozigóticos para 40 hV λ e quatro hJ λ . segmentos de genes, incluindo uma sequência de gene humana V λ a J λ operativamente ligado ao gene Camundongo Ck. Esta experiência foi repetida com grupos adicionais dos camundongos descritos acima e demonstraram resultados semelhantes (dados não mostrados).

Tabela 3

GENOTIPO	% DE CÉLULAS B	% Ig κ +	% Ig λ +
TIPO SELVAGEM	46,2	91,0	3,6
12 hV λ +hJ λ 1	28,3	10,4	62,5
12 hV λ -V κ J κ -hJ λ 1	12,0	11,0	67,5
12 hV λ -V κ J κ -4hJ λ	41,8	17,2	68,4
28 hV λ +hJ λ 1	22,0	13,3	51,1
40 hV λ +hJ λ 1	28,2	24,3	53,0

Tabela 4

GENOTIPO	% DE CÉLULAS B	% Ig κ +	% Ig λ +
TIPO SELVAGEM	49,8	91,2	3,5
40 hV λ -V κ J κ -4hJ λ	33,3	41,6	43,1

Tabela 5

GENOTIPO	% de células B	% de células B maduras	% de células B imaturas	% Ig κ +de células B imaturas	% Ig λ + de células B imaturas
TIPO SELVAGEM	62,2	9,2	12,0	79,0	8,84
40hV λ -V κ J κ -4hJ λ	60,43	2,59	7,69	38,29	43,29

A utilização do gene hV λ humano em camundongos suportando os segmentos de genes humanos de cadeia leve.

[000252] Os camundongos heterozigotos para uma primeira inserção de sequências λ humanas, (hV 3 a 12 a λ . hV λ .3 a 1 e hJ λ 1, figura 5B) e homozigotos para uma inserção terço dos λ humanos, sequências (hV λ ,5 a 52 a hV λ 3 a 1 e NM, Figura 5B) foram analisadas para λ humanos, a utilização do gene da cadeia leve por transcriptase reversa a reação em cadeia da polimerase (RT a PCR) utilizando RNA isolado a partir de esplenócitos.

[000253] Em resumo, os baços foram colhidos e perfundidos com 10 mL de RPMI a 1640 (Sigma) com 5 % de HI a FBS em sacos estéreis descartáveis. Cada saco que contém um único baço foi então colocada em um STOMACHERTM (Seward) e homogeneizado a uma definição média durante 30 segundos. Baços homogeneizados foram filtrados através de um filtro de células 12:07 e depois peletizada com uma centrifugadora (1000 rpm durante 10 minutos) e os glóbulos vermelhos foram lisados em BD PHARM LYSETM (BD Biosciences) durante três minutos. Os esplenócitos foram diluídas com meio RPMI a 1640 e nohV λ mente centrifugado, seguido por ressuspensão em 1 ml de PBS (Irvine Scientific). O RNA foi isolado a partir de esplenócitos peletizadas, utilizando técnicas convencionais conhecidas na técnica.

[000254] RT a PCR foi realizada em RNA de esplenócitos utilizando iniciadores específicos para os segmentos de genes humanos hV λ . e o camundongo do gene CK (Tabela 6). Os produtos de PCR foram purificados em gel e clonado em pCR2.1 a TOPO TA vetor (Invitrogen) e sequenciado com iniciadores M13 Forward (GTAAAACGAC GGCAG; SEQ ID NO: 55) e M13 Reverse (CAGGAAACAG CTATGAC; SEQ ID NO: 56), localizado dentro o vetor em local que flanqueia o local de clonagem. Oitenta e quatro clones totais derivadas das inserções de primeira e terceira sequências de λ humanos foram sequenciados para determinar hV λ a utilização do gene (Tabela 7). A sequência de nucleotídeos do hV λ hJ λ a,1 a MCK junção por selecionado RT a PCR

clones é mostrado na Figura 11.

[000255] Em uma forma similar, os camundongos homozigóticos para uma inserção terço humano luz λ sequências de genes de cadeia (isto é, 40 segmentos do gene hV λ e quatro segmentos de genes hJ λ incluindo uma sequência de gene humana VK a J λ , inferior da figura 7B). operacionalmente ligadas ao gene camundongo endógeno CK foram analisadas para uso humano k gene da cadeia leve por RT a PCR utilizando RNA isolado a partir de esplenócitos (como descrito acima). O ser humano λ cadeia leve de uso segmento de gene para 26 RT a PCR selecionados clones estão apresentados na Tabela 8. A sequência de nucleotídeos da junção hV λ . a hJ λ MCK a selecionado para RT a PCR de clones é mostrado na Figura 12.

[000256] Em uma forma similar, os camundongos homozigóticos para uma primeira inserção do ser humano λ cadeia leve segmentos de genes (12 hv λ segmentos de genes, e hJ11, figura 4A e figura 5A) operativamente ligados ao camundongo C2 endógeno dois genes foram analisadas quanto ao humano λ a utilização do gene da cadeia leve por RT a PCR utilizando RNA isolado a partir de esplenócitos (como descrito acima). Os iniciadores específicos para segmentos de gene hV λ . (Tabela 6) foram emparelhados com um dos dois iniciadores específicos para o gene de camundongo CK2; C2 2 a 1 (SEQ ID NO: 104) ou CK2 a 2 (SEQ ID NO: 105).

[000257] Os segmentos de gene hV λ Múltiplos rearranjados para HK1 foram observados a partir dos clones RT- PCR de camundongos portadores humanos de luz segmentos de genes no sítio de cadeia leve λ de camundongo endógeno . A sequência de nucleotídeos da junção hV λ hJ λ a a mC λ 2 por RT a PCR dos clones selecionados é mostrada na Figura 13.

Tabela 6

5'hVλ iniciador	Sequência (5'-3')	SEQ ID NO:
VLL a 1	CCTCTCCTCC TCACCCCTCCT	40
VLL a 1n	ATGRCCDGST YYYCTCTCCT	41
VLL a 2	CTCCTCACTC AGGGCACA	42
VLL a 2n	ATGGCCTGGG CTCTGCTSCT	43
VLL a 3	ATGGCCTGGA YCSCTCTCC	44
VLL a 4	TCACCATGGC YTGGRYCYCM YTC	45
VLL a 4.3	TCACCATGGC CTGGGTCTCC TT	46
VLL a 5	TCACCATGGC CTGGAMTCYT CT	47
VLL a 6	TCACCATGGC CTGGGCTCCA CTACTT	48
VLL a 7	TCACCATGGC CTGGACTCCT	49
VLL a 8	TCACCATGGC CTGGATGATG CTT	50
VLL a 9	TAAATATGGC CTGGGCTCCT CT	51
VLL a 10	TCACCATGCC CTGGGCTCTG CT	52
VLL a 11	TCACCATGGC CCTGACTCCT CT	53

3' Camundongo iniciador	Sequência (5'-3')	SEQ ID NO:
mIgKC3'-1	CCCAAGCTTA CTGGATGGTG GGAAGATGGA	54

Tabela 7

hVλ	Números observados de clones
3-1	2
4-3	3
2-8	7
3-9	4
3-10	3
2-14	1
3-19	1

hVλ	Números observados de clones
2-23	7
3-25	1
1-40	9
7-43	2
1-44	2
5-45	8
7-46	3
9-49	6
1-51	3

Tabela 8

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

CLONE	hVλ	hJλ
7a-2	9-49	2
7a-7	3-10	7
7b-2	7-43	3
7b-7	7-46	7
7b-8	7-43	3
11a-1	5-45	2
11a-2	5-43	7

[000258] A Figura 11 mostra a sequência da junção hVλ, a hal a MCλ por RT a PCR a partir de clones de camundongos portadores de uma inserção dos primeiro e terceiro segmentos de genes hVλ. com um único segmento de gene hVλ. As sequências mostradas na Figura 11 ilustram os rearranjos envolvendo os únicos hVλ diferentes, com segmentos do gene hal recombinados para o gene Camundongo Ck. Camundongos heterozigotos portadores de uma única modificação endógena Sítio K contendo 12 hVλ, segmentos de gene e hal e camundongos homozigóticos carregam dois modificando sítio K endógenos contendo 40 segmentos de gene hVλ e hJλ 1 foram ambos capazes de produzir segmentos do gene humano λ operativamente ligado ao gene Camundongo Ck e produzir células B que expressam humano λ cadeias leves. Estes rearranjos demonstram que o local quiméricos foram capazes de rearranjar independentemente humana λ em segmentos de genes múltiplos, as células B independentes nestes camundongos. Além disso, estas modificações para o sítio da cadeia K endógena luz não tornar qualquer dos segmentos de genes hVλ inoperáveis ou prevenir o local quimérico de recombinação hVλ múltiplo e um segmento de gene hJλ (Jλ 1) durante o desenvolvimento de células B, como evidenciado por 16 segmentos de genes diferentes hVλ que foram observados para reorganizar com hJλ 1 (Tabela 7). Além disso, estes camundongos produziram os anticorpos funcionais contendo os segmentos Vκ humanos rearranjados ao gene Jλ

operativamente ligados a genes de camundongo CK, como parte da cadeia leve de imunoglobulina endógena repertório.

[000259] A figura 12 mostra a sequência da junção hV λ a hJ λ a MC λ para uma seleção de RT a PCR a partir de clones de camundongos homozigóticos para 40 hV λ , E quatro segmentos de genes, incluindo um humano hJ λ sequência genômica λ As sequências mostrado na Figura 12 ilustram outros rearranjos envolvendo múltiplos segmentos únicos hV λ diferentes genes, que abrangem todo o local quimérico, com múltiplos segmentos hJ λ diferentes genes rearranjados e operativamente ligado ao gene Camundongo Ck. Camundongos homozigóticos portadores modificado local endógenos K contendo 40 hV λ . e quatro segmentos de genes hJ λ também foram capazes de produzir segmentos de k humanos gene operativamente ligado ao gene de camundongo CK e produzir células B que expressam humano λ cadeias leves. Estes rearranjos demonstram ainda que os estádios de todos os locais quiméricos foram capazes de, independentemente reorganizar os segmentos dos genes humanos k em múltiplas células B independentes nestes camundongos. Além disso, estas modificações adicionais à endógeno sítio de cadeia leve K demonstra que a inserção de cada um ser humano λ segmentos de gene não faz nenhuma da hV λ e/ou segmentos de genes J λ inoperáveis ou prevenir o local quimérico de recombinar o hV λ . e segmentos de genes J λ durante o desenvolvimento de células B, como evidenciado por 12 segmentos diferentes de genes hV λ que foram observados para reorganizar com todos hJ λ quatro segmentos do gene (Tabela 8) a partir do clone selecionado 26 RT a PCR. Além disso, estes camundongos também produziu anticorpos humanos funcionais contendo segmentos V λ a J λ gene operativamente ligado a regiões de camundongo CK, como parte da cadeia de imunoglobulina endógena repertório luz.

[000260] A figura 13 mostra a sequência da junção hV λ . a hJ λ a mCk2

por três indivíduos RT a PCR a partir de clones de camundongos homozigóticos para 12 segmentos de gene e hV λ . hJ λ 1. As sequências mostrado na Figura 13 ilustram outros rearranjos envolvendo os segmentos únicos hV λ . diferentes genes, que abrangem todo o comprimento da primeira inserção, com hJ λ 1 rearranjado e operativamente ligado ao gene de camundongo CK2 (2D1 = V λ 2 a 8J λ 1; 2D9 = VK3 a 10J λ 1; 3E15 = V λ Um clone demonstra o rearranjo improutivo devido a adições de N no hV λ a hJ λ , junção (2D1, figura13). Este não é raro na recombinação V (D) J, como a junção de segmentos de genes durante a recombinação foi mostrado para ser impreciso. Embora este clone representa um presente improutivo recombinante no repertório da cadeia leve de estes camundongos, isto demonstra que o mecanismo genético que contribui para a diversidade juncional entre genes do anticorpo está a funcionar normalmente nestes camundongos e que conduz a um repertório de anticorpos contendo cadeias leves com maior diversidade.

[000261] Os camundongos endógenos portadores homozigóticos modificados no sítio λ contendo 12 segmentos de genes hV λ e hJ λ 1 também foram capazes de produzir segmentos de genes humanos λ operativamente ligadas a um gene endógeno do camundongo C λ e produzir células B que expressam reversa cadeias λ leves quiméricas que contenham as regiões ligadas à hV λ camundongo C λ λ , regiões. Estes rearranjos demonstram ainda que os segmentos da cadeia leve de genes humanos λ colocados no local outro de cadeia leve (isto é, o lugar geométrico λ) foram capazes de rearranjar independentemente humanos segmentos de genes λ em múltiplas células B independentes nestes camundongos. Além disso, as modificações no endógeno sítio de cadeia leve k demonstram que a inserção de segmentos de genes humanos λ não tornar qualquer dos hV λ e/ou segmentos de genes hJ λ 1 inoperáveis ou prevenir o local quimérico de recombinar o hV λ e hJ λ

1 segmentos de genes de células B durante desenvolvimento. Além disso, estes camundongos também produziram os anticorpos humanos funcionais contendo segmentos $V\lambda$ a $J\lambda$ gene operativamente ligado a uma região $C\lambda$ camundongo, como parte do repertório da cadeia leve de imunoglobulina endógena.

[000262] Conforme mostrado neste exemplo, os camundongos portadores humanos de segmentos de gene de cadeia leve λ no sítio K endógeno e no sítio de cadeia leve λ são capazes de rearranjar os segmentos de gene humanos leves λ de cadeia e expressando- os, no contexto de uma região de Camundongo Ck e/ou $C\lambda$, como parte do repertório de anticorpos normal do camundongo porque uma cadeia leve funcional é requerida para vários pontos de controlo em células B em desenvolvimento tanto o baço e medula óssea λ . Além disso, os subconjuntos iniciais de células B (por exemplo, pré, pró a células B e de transição) demonstram um fenótipo normal nestes camundongos, em comparação com ninhada de tipo selvagem (Figuras 9D, 10A e 10B). Um pequeno déficit na medula óssea e populações de células B periféricas foram observadas, o que pode ser atribuído a uma eliminação de um subconjunto de auto-reactividade das células B imaturas e/ou uma associação de subconjunto óptima de cadeia leve humana com λ da cadeia pesada de camundongo. No entanto, a utilização de $Ig\kappa$ / $Ig\lambda$ observado nestes camundongos demonstra uma situação que é mais parecida com a expressão da cadeia leve humana do que a observada em camundongos.

Exemplo VI

Criação de camundongos Expressando Cadeias Leves λ Humanas A partir de um sítio de cadeias Leves endógenas

[000263] Para otimizar a utilização dos segmentos de genes λ humano em um sítio da cadeia leve de camundongo endógeno, os camundongos com os segmentos de genes humanos não rearranjados

λ são criados para outro camundongo contendo uma deleção no sítio da cadeia oposta endógeno luz (ou K ou λ). Por exemplo, segmentos de gene humanos λ posicionado no local endógeno K seriam os únicos segmentos da cadeia leve funcional de genes presentes em um camundongo que também realizada uma deleção no λ endógeno, sítio de cadeia leve. Deste modo, a progenia obtida expressaria apenas cadeias leves humanas, tal como descrito nos exemplos precedentes. A criação é realizada por meio das técnicas padrão reconhecidos na técnica e, em alternativa, por empresas comerciais, por exemplo, The Jackson Labocamundongory. Cepas de camundongos portadores humanos λ , segmentos de gene de cadeia leve no local endógeno K uma deleção do sítio de cadeia leve endógeno λ são rastreados quanto à presença dos únicos reverse a quiméricos (camundongo a humano) cadeias leves λ e ausência de camundongo endógeno λ , cadeias leves.

[000264] Os camundongos com um sítio da cadeia leve λ não rearranjados humanos, também são criados com camundongos que contêm uma substituição do sítio de cadeia pesada camundongo endógeno gene Variável com o sítio da cadeia pesada humana do gene Variável (ver EUA 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals, o VELOCALMMUNE ® camundongo geneticamente modificado). O camundongo ® VELOCALMMUNE inclui, em parte, com um genoma que comprehende humanos regiões Variáveis da cadeia pesada ligados operacionalmente ao camundongo endógenas local da região constante de modo a que o camundongo produz anticorpos comprehendendo uma região Variável de cadeia pesada humano e um camundongo região constante da cadeia pesada, em resposta a antigênico estimulação. O DNA que codifica para as regiões Variáveis das cadeias pesadas dos anticorpos pode ser isolado e ligado operativamente a DNA que codifica para as regiões humanas constantes da cadeia pesada. O DNA pode

então ser expresso em uma célula capaz de expressar a cadeia pesada totalmente humanos do anticorpo. Após a criação de uma programação adequada, camundongos portadores de uma substituição da sítio de cadeia pesada de camundongo endógeno, com o sítio da cadeia pesada humana e um humano não rearranjados λ sítio da cadeia leve no endógeno sítio de cadeia leve K é obtido. Contendo anticorpos somaticamente mutados regiões humanas de cadeia pesada Variável e λ humanos, as regiões Variáveis de cadeia leve podem ser isoladas por meio da imunização com um antígeno de interesse.

Exemplo VII

Geração de anticorpos de camundongos Expressando as cadeias pesadas Humanas e as cadeias leves Humanas

[000265] Depois de reprodução que contêm os camundongos não rearranjados humano sítio K de cadeia leve de várias cepas que contêm modificações desejadas e deleções de outro local de Ig endógenos (como descrito acima), os camundongos selecionados são imunizados com um antígeno de interesse.

[000266] Em geral, um camundongo VELOCALMMUNE ® contendo um dos únicos humanos rearranjados germinativas regiões de cadeia leve é desafiada com um antígeno e de células linfáticas (tais como células a B) são recuperados a partir do soro dos animais. As células podem ser linfáticos fundidos com uma linha celular de mieloma para preparar linhas celulares de hibridoma imortais e estas linhas celulares de hibridoma são rastreadas e selecionadas para identificar linhas celulares de hibridoma que produzem anticorpos contendo a cadeia pesada humana e da cadeia leve humana λ que são específicos para o antígeno utilizado para a imunização. DNA que codifica para as regiões Variáveis das cadeias pesadas e o λ , cadeias leves podem ser isolados e ligados ao desejáveis isotípicos regiões constantes da cadeia pesada e da cadeia leve. Devido à presença do adicional h λ a, segmentos de

gene, em comparação com o camundongo endógeno λ local, a diversidade do repertório da cadeia leve é dramaticamente aumentada e confere uma maior diversidade do repertório específico de antígeno após imunização. As resultantes sequências de anticorpos clonados pode ser subsequentemente produzido em uma célula, tal como uma célula CHO. Alternativa mente, o DNA que codifica os anticorpos específicos de antígenos quiméricos ou os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas podem ser isolados diretamente a partir de antígenos específicos de linfócitos (por exemplo, células B).

[000267] Inicialmente, os anticorpos quiméricos de alta afinidade são isolados com uma região Variável humana e uma região constante de camundongo. Como descrito acima, os anticorpos são caracterizados e selecionados para as características desejáveis, incluindo a seletividade, afinidade, epítopo, etc. As regiões constantes de camundongo são substituídas por meio de uma região constante humana desejada para gerar o anticorpo totalmente humano contendo uma cadeia pesada somaticamente mutada humana e uma cadeia leve k humana derivada de um sítio de cadeia leve λ não rearranjado humano da presente invenção. As regiões constantes humanas adequadas incluem, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 do tipo selvagem ou modificada.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparar um anticorpo que se liga a um antígeno de interesse, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) expor um camundongo ao antígeno de interesse, em que o camundongo é determinado por compreender:

uma pluralidade de segmentos gênicos da região variável de cadeia leve λ ($hV\lambda$) da imunoglobulina humana não rearranjados e pelo menos um segmento gênico J de cadeia leve λ ($hJ\lambda$) da imunoglobulina humana não rearranjado, contíguo com uma sequência de ácido nucleico da região constante da cadeia leve K de imunoglobulina de camundongo;

(b) obter um ou mais linfócitos B do camundongo de (a), em que um ou mais linfócitos B formam o anticorpo que se liga ao antígeno de interesse; e

(c) identificar uma sequência de ácido nucleico que codifica uma cadeia leve de imunoglobulina do anticorpo, em que a cadeia leve de imunoglobulina compreende um domínio variável de cadeia leve λ de imunoglobulina humana e um domínio constante K de imunoglobulina de camundongo; e

(d) empregar a sequência de ácido nucleico de (c) com uma sequência de ácido nucleico da região constante da cadeia leve de imunoglobulina humana para fazer um anticorpo humano que se liga ao antígeno de interesse.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é destituído de um segmento gênico funcional J_k de camundongo e/ou V_k de camundongo.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de segmentos gênicos $hV\lambda$ não rearranjados são pelo menos 12 segmentos gênicos, pelo menos 28 segmentos gênicos, ou pelo menos 40 segmentos dos genes.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos um segmento gênico hJλ é selecionado dentre o grupo consistindo em Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ7, e uma combinação dos mesmos.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que um lócus endógeno da cadeia leve λ de imunoglobulina de camundongo é deletado na totalidade ou em parte.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de ácido nucleico da região constante de cadeia leve k de imunoglobulina de camundongo está em um lócus endógeno de cadeia leve k de imunoglobulina de camundongo.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que cerca de 10 % a cerca de 45 % das células B do camundongo expressam um anticorpo que compreende uma cadeia leve λ de imunoglobulina que compreende um domínio variável de cadeia leve (Vλ) de imunoglobulina humana e um domínio constante da cadeia leve k (Ck) de imunoglobulina de camundongo.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o domínio Vλ humano é derivado de uma sequência de ácido nucleico hVλhJλ rearranjada selecionada dentre o grupo que consiste em Vλ3-1/Jλ1, Vλ3-1/Jλ7, Vλ4-3/Jλ1, Vλ4-3/Jλ7, Vλ2-8/Jλ1, Vλ3-9/Jλ1, Vλ3-10/Jλ1, Vλ3-10/Jλ3, Vλ3-10/Jλ7, Vλ2-14/Jλ1, Vλ3-19/Jλ1, Vλ2-23/Jλ1, Vλ3-25/Jλ1, Vλ1-40/Jλ1, Vλ1-40/Jλ2, Vλ1-40/Jλ3, Vλ1-40/Jλ7, Vλ7-43/Jλ1, Vλ7-43/Jλ3, Vλ1-44/Jλ1, Vλ1-44/Jλ7, Vλ5-45/Jλ1, Vλ5-45/Jλ2, Vλ5-45/Jλ7, Vλ7-46/Jλ1, Vλ7-46/Jλ2, Vλ7-46/Jλ7, Vλ9-49/Jλ1, Vλ9-49/Jλ2, Vλ9-49/Jλ7 e Vλ1-51/Jλ1.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma região intergênica Vκ-Jκ humana a partir de um lócus da cadeia leve k de imunoglobulina humana, em que a região intergênica Vκ-Jκ humana é contígua com a

sequência de ácido nucleico $V\lambda$ e a sequência de ácido nucleico J .

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a região intergênica $Vk-Jk$ humana é colocada entre a sequência de ácido nucleico $V\lambda$, e a sequência de ácido nucleico J .

11. Método para preparar um anticorpo que se liga a um antígeno de interesse, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) expor um camundongo ao antígeno de interesse, em que o camundongo é determinado por compreender:

(i) pelo menos 12 a pelo menos 40 segmentos gênicos da região variável de cadeia leve λ de imunoglobulina humana não rearranjados e pelo menos um segmento gênico $J\lambda$ humano em um locus endógeno da cadeia leve de imunoglobulina de camundongo;

(ii) uma sequência intergênica $Vk-Jk$ humana situada entre os pelo menos 12 a pelo menos 40 segmentos gênicos da região variável da cadeia leve de imunoglobulina humana e $J\lambda$ pelo menos uma sequência de ácido nucleico $J\lambda$ humana;

em que o camundongo expressa um anticorpo que compreende uma cadeia leve de imunoglobulina que compreende um domínio $V\lambda$ humano, um domínio $J\lambda$ humano e um domínio Ck de camundongo;

(b) obter um ou mais linfócitos B do camundongo de (a), em que um ou mais linfócitos B formam o anticorpo que se liga ao antígeno de interesse; e

(c) identificar uma sequência de ácido nucleico que codifica uma cadeia leve de imunoglobulina do anticorpo, em que a cadeia leve de imunoglobulina compreende um domínio variável de cadeia leve λ de imunoglobulina humana e um domínio constante K de imunoglobulina de camundongo; e

(d) empregar a sequência de ácido nucleico de (c) com uma sequência de ácido nucleico da região constante da cadeia leve de

imunoglobulina humana para fazer um anticorpo humano que se liga ao antígeno de interesse.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o camundongo apresenta uma utilização κ a uma utilização λ na proporção de cerca de 1:1.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que uma população de células B imaturas obtidas a partir da medula óssea do camundongo exibe uma utilização κ a uma utilização λ na proporção de cerca de 1:1.

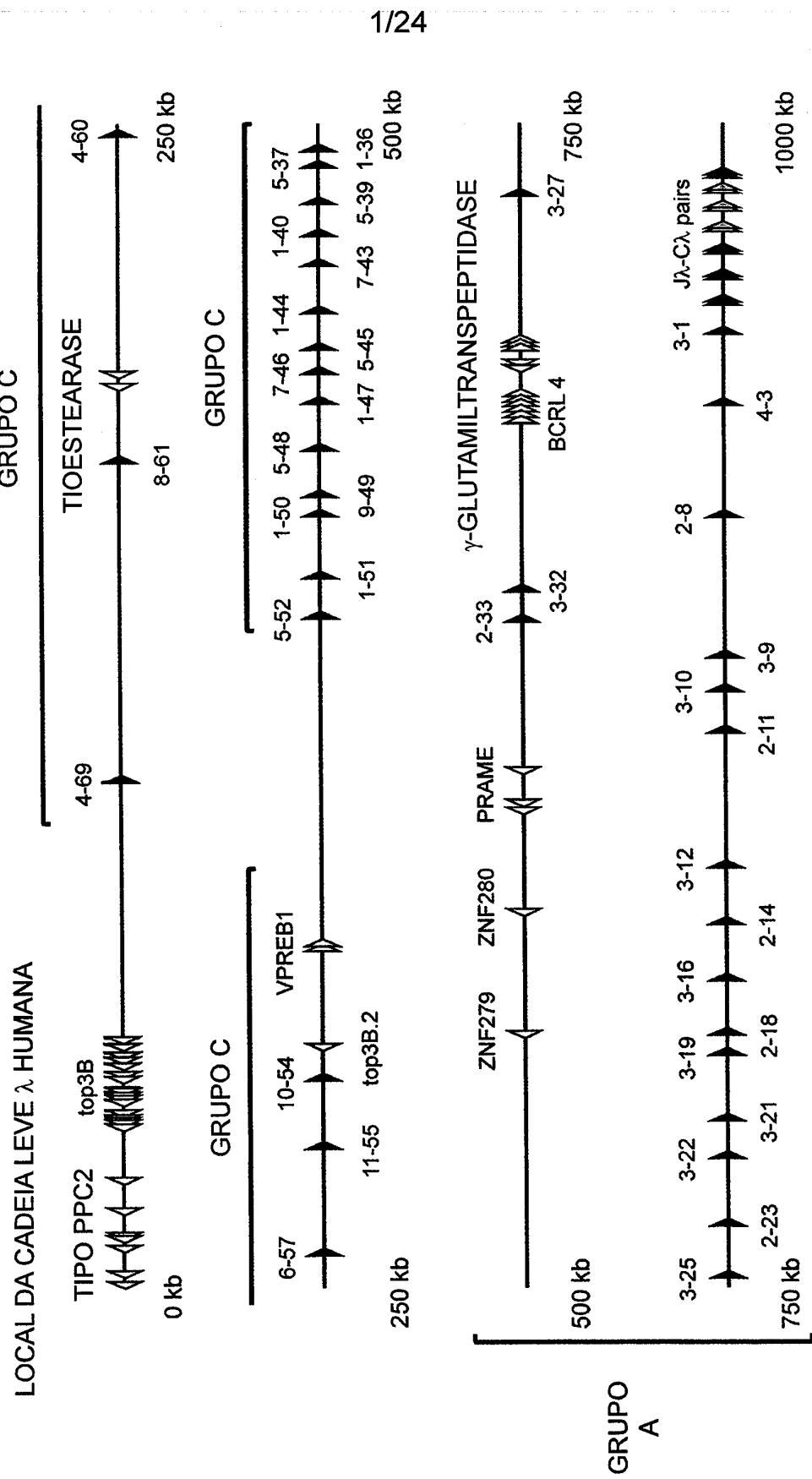


FIG. 1

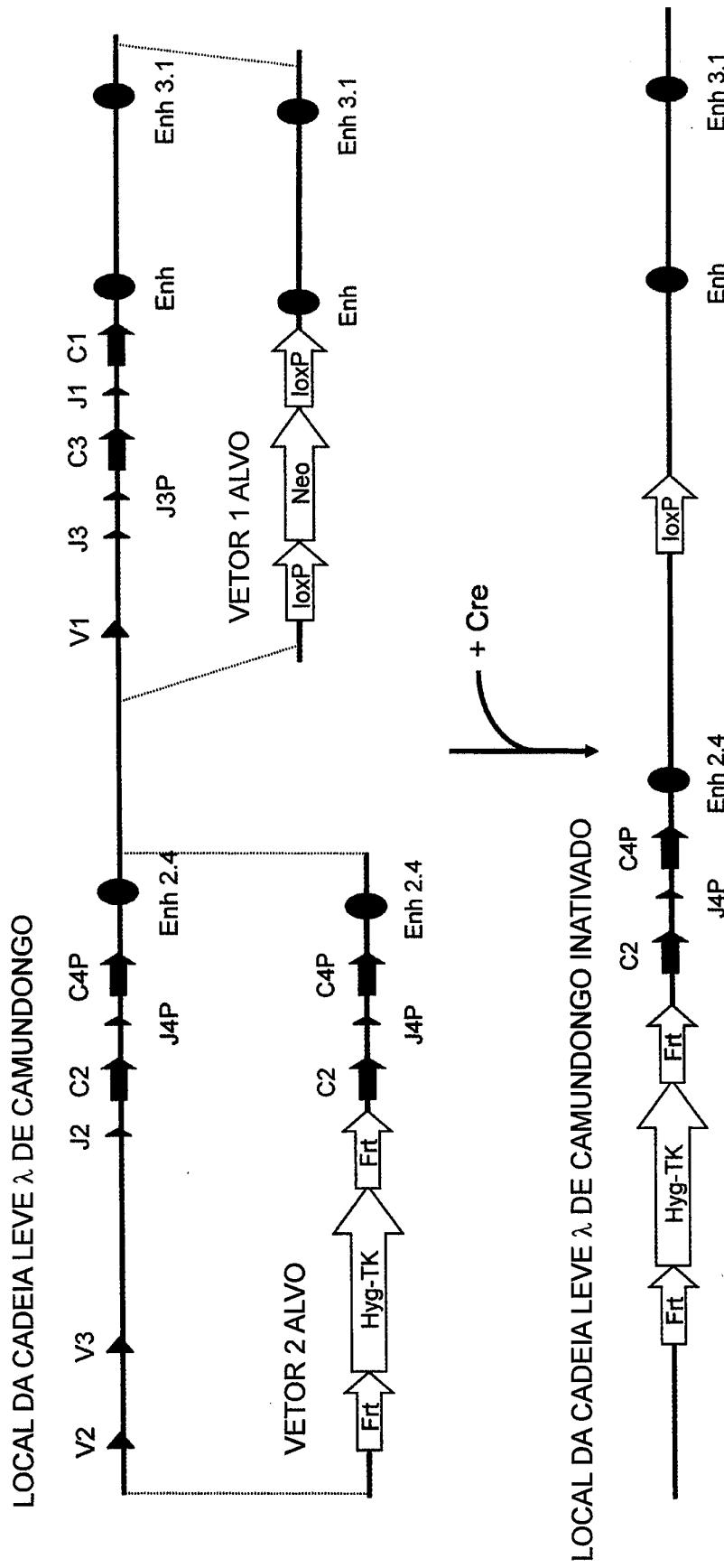


FIG. 2

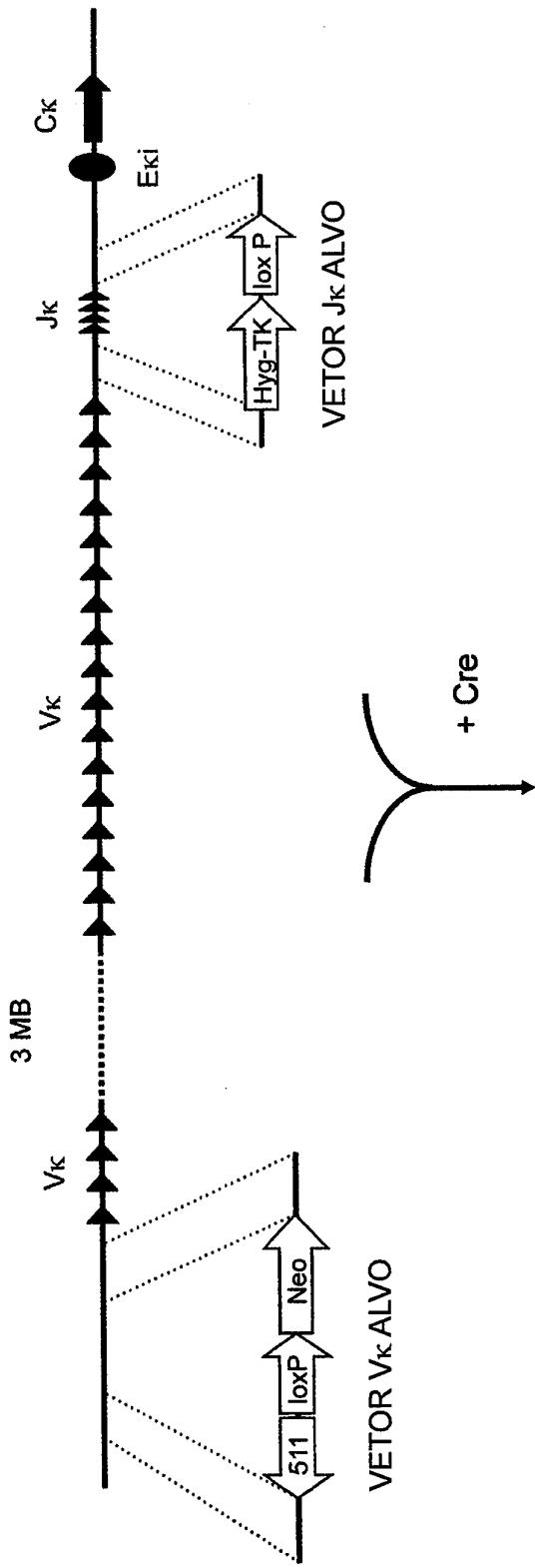
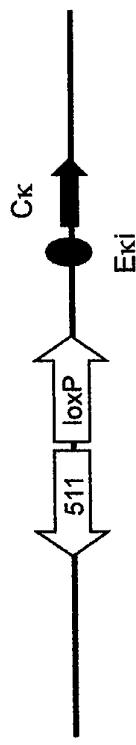
LOCAL DA CADEIA LEVE κ DE CAMUNDONGOLOCAL DA CADEIA LEVE κ DE CAMUNDONGO ELIMINADO

FIG. 3

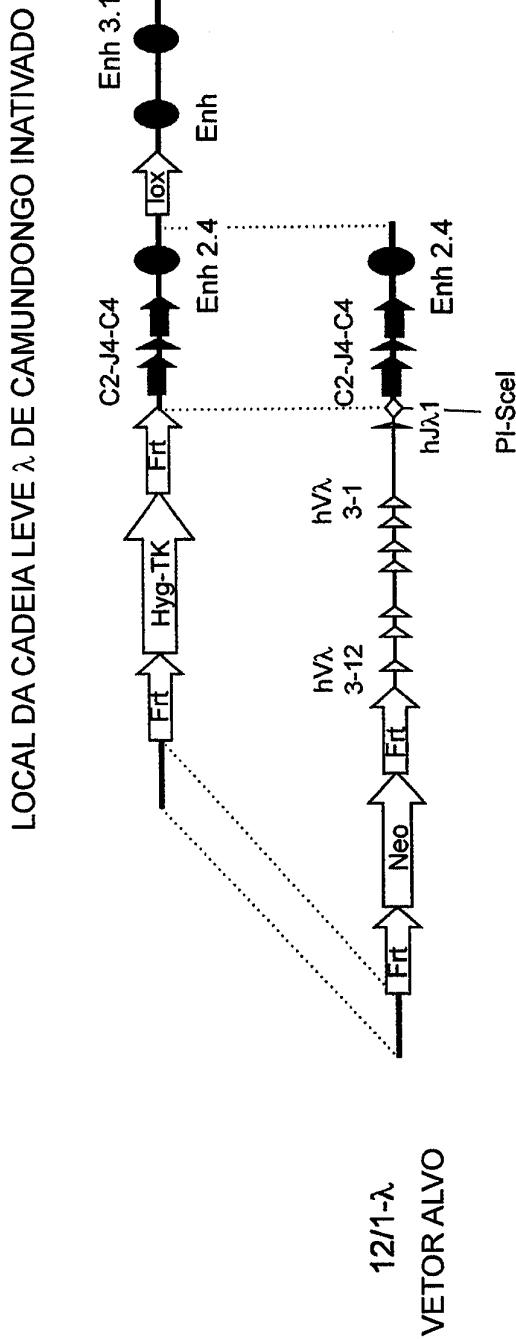


FIG. 4A

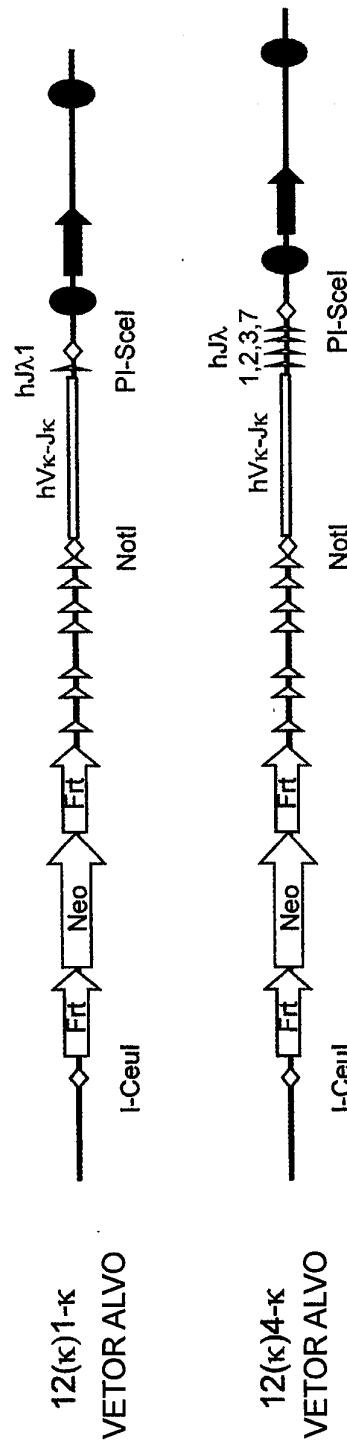
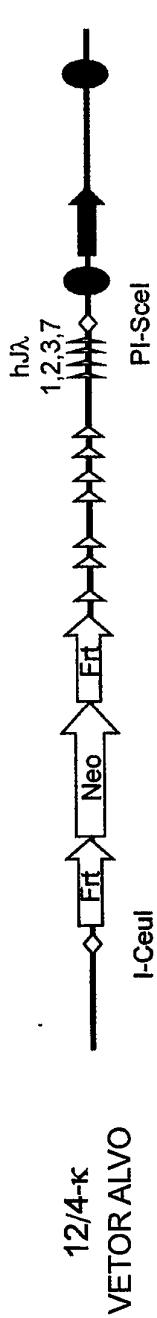
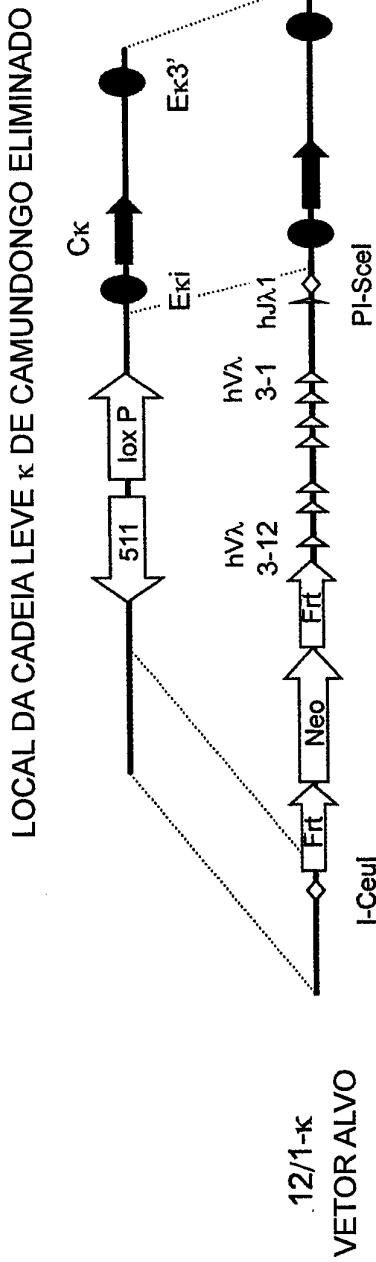


FIG. 4B

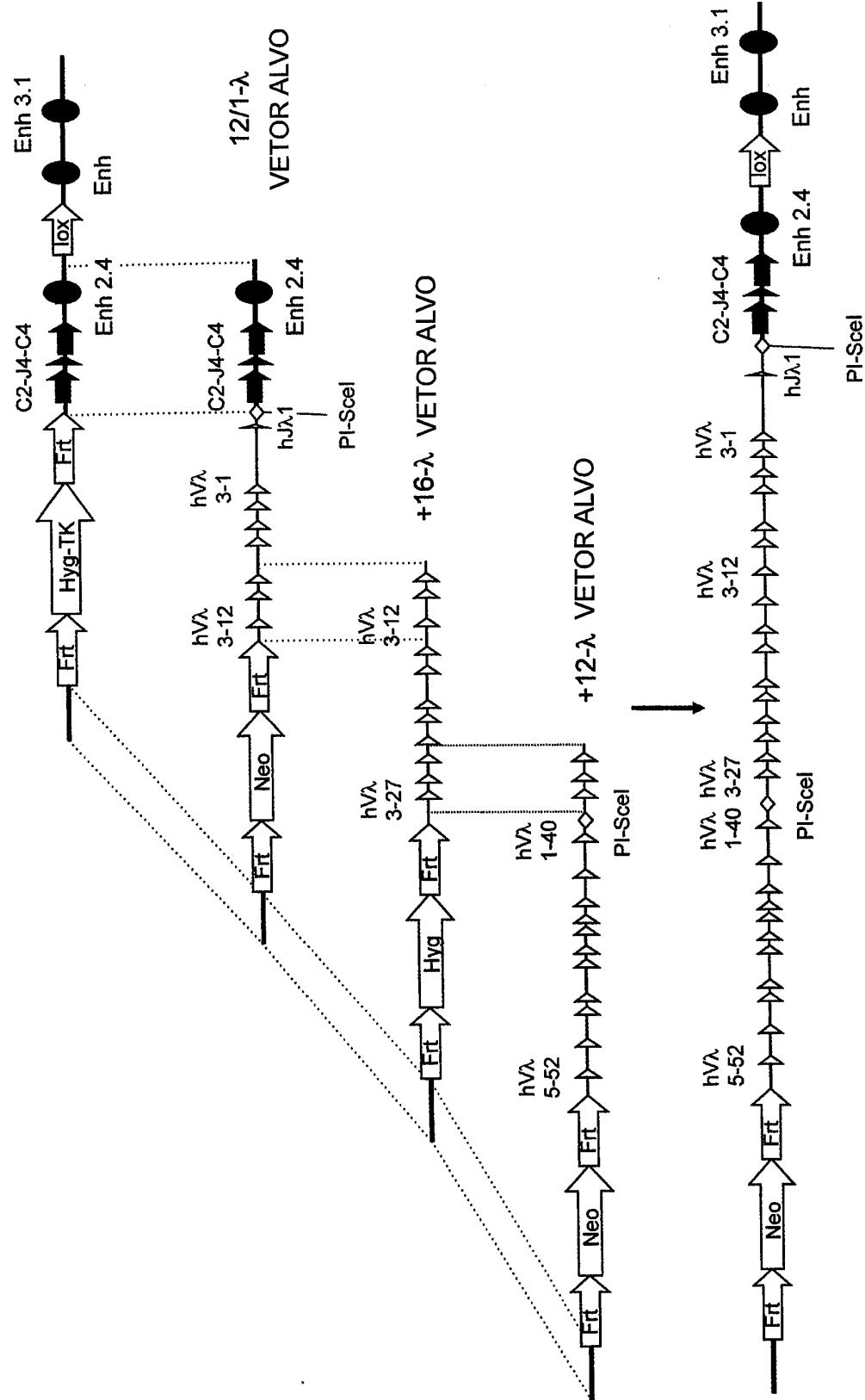
LOCAL DA CADEIA LEVE λ DE CAMUNDONGO INATIVADO

FIG. 5A

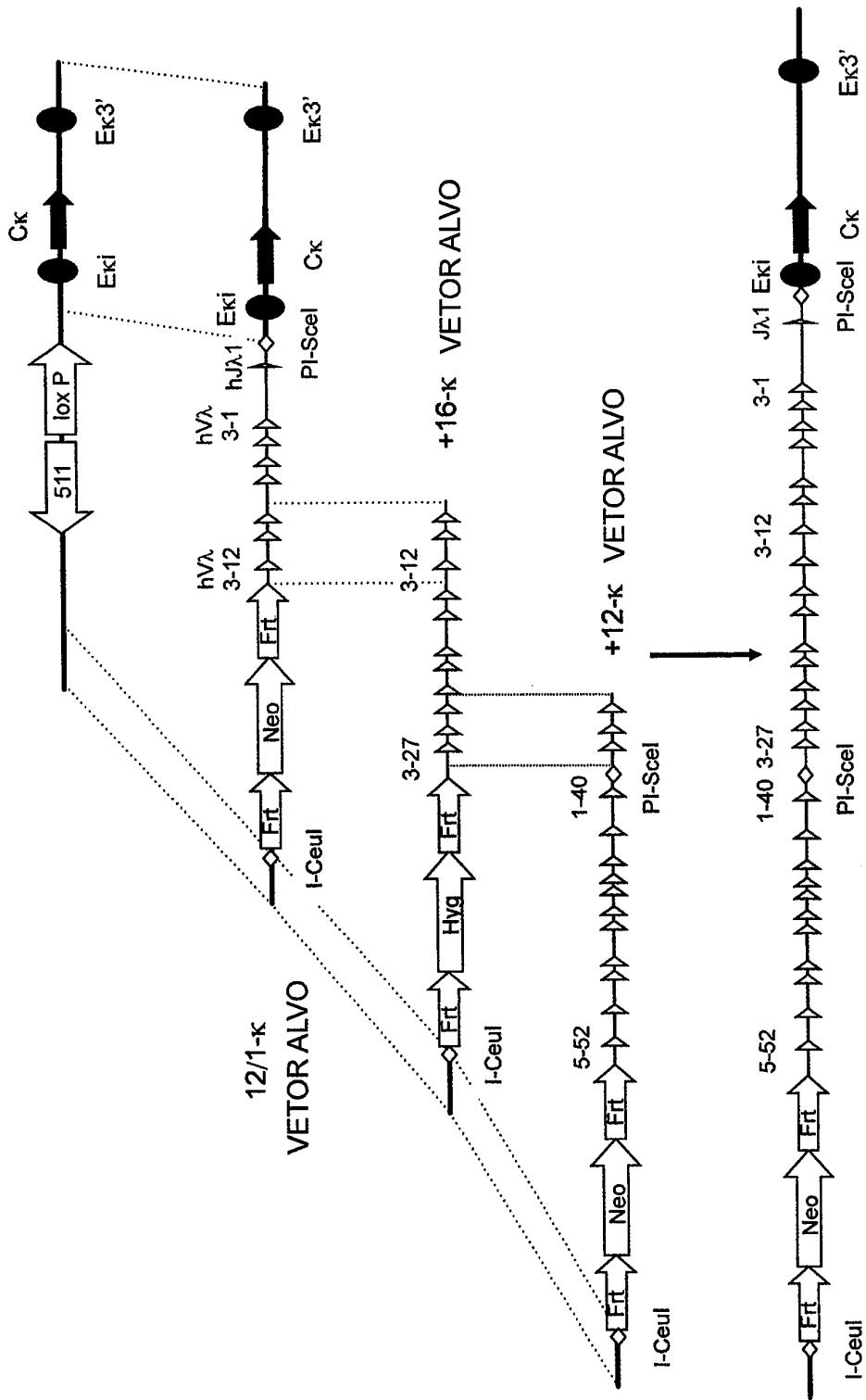
LOCAL DA CADEIA LEVE κ DE CAMUNDONGO ELIMINADO

FIG. 5B

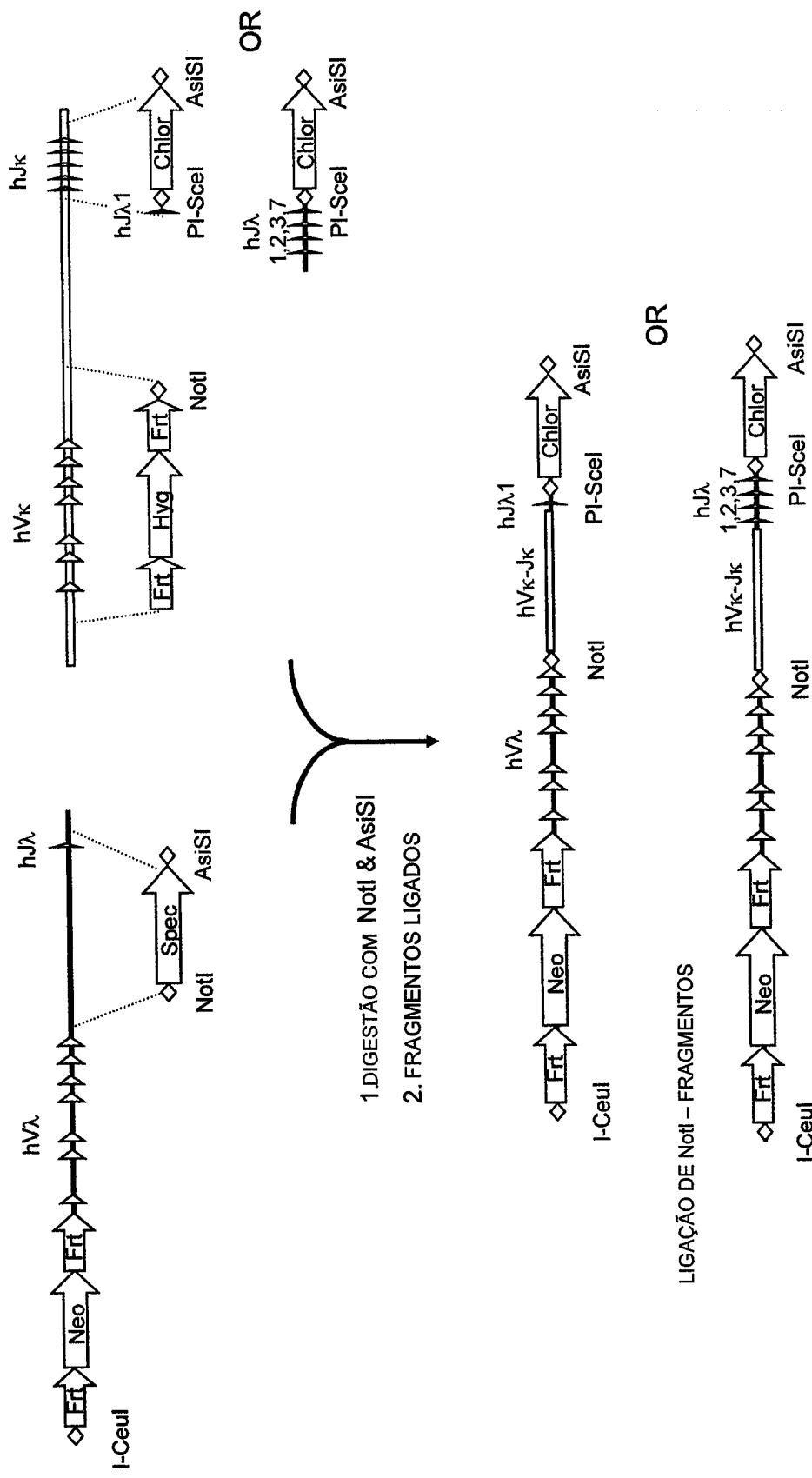


FIG. 6

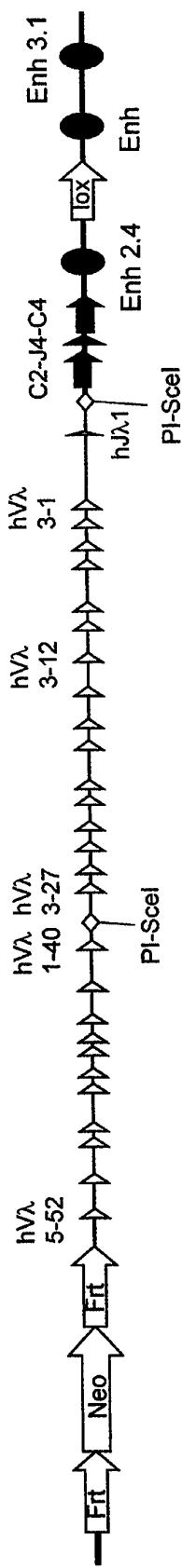


FIG. 7A

10/24

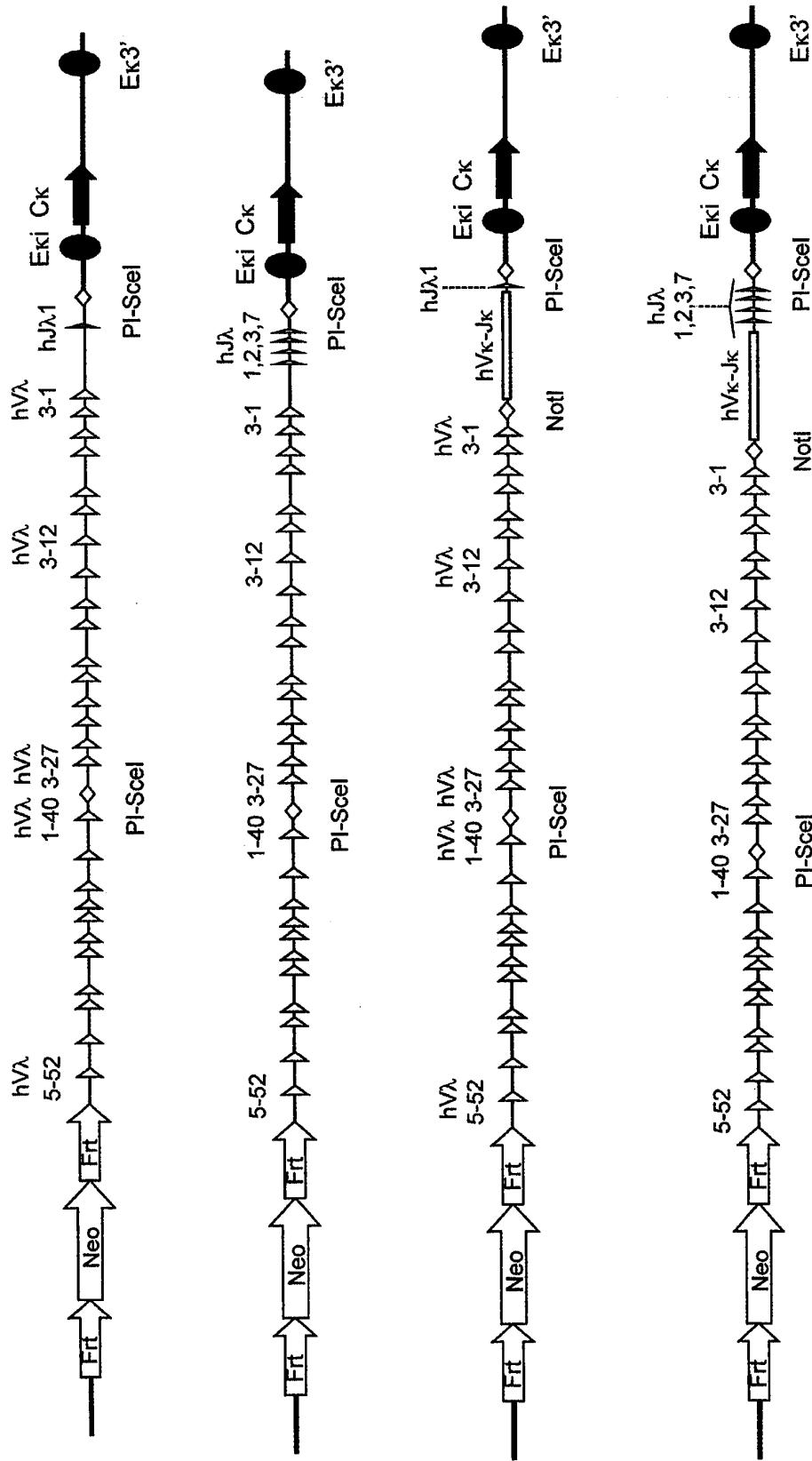


FIG. 7B

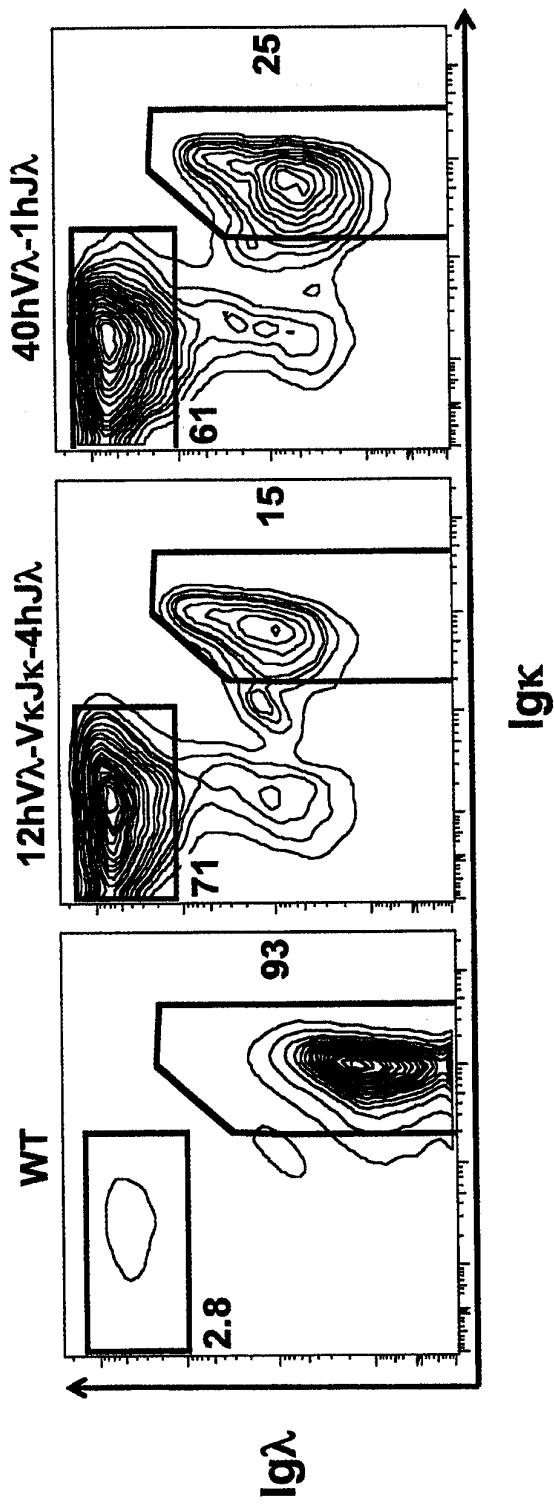


FIG. 8A

12/24

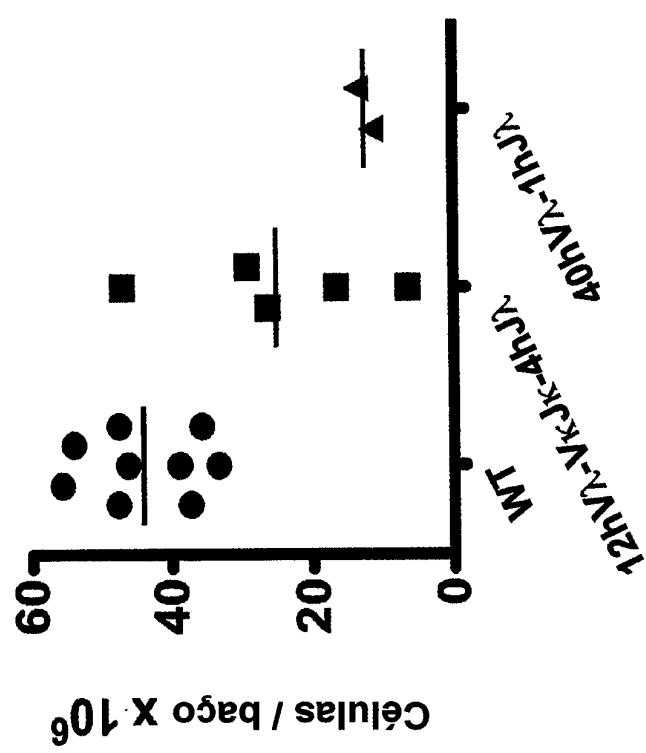


FIG. 8B

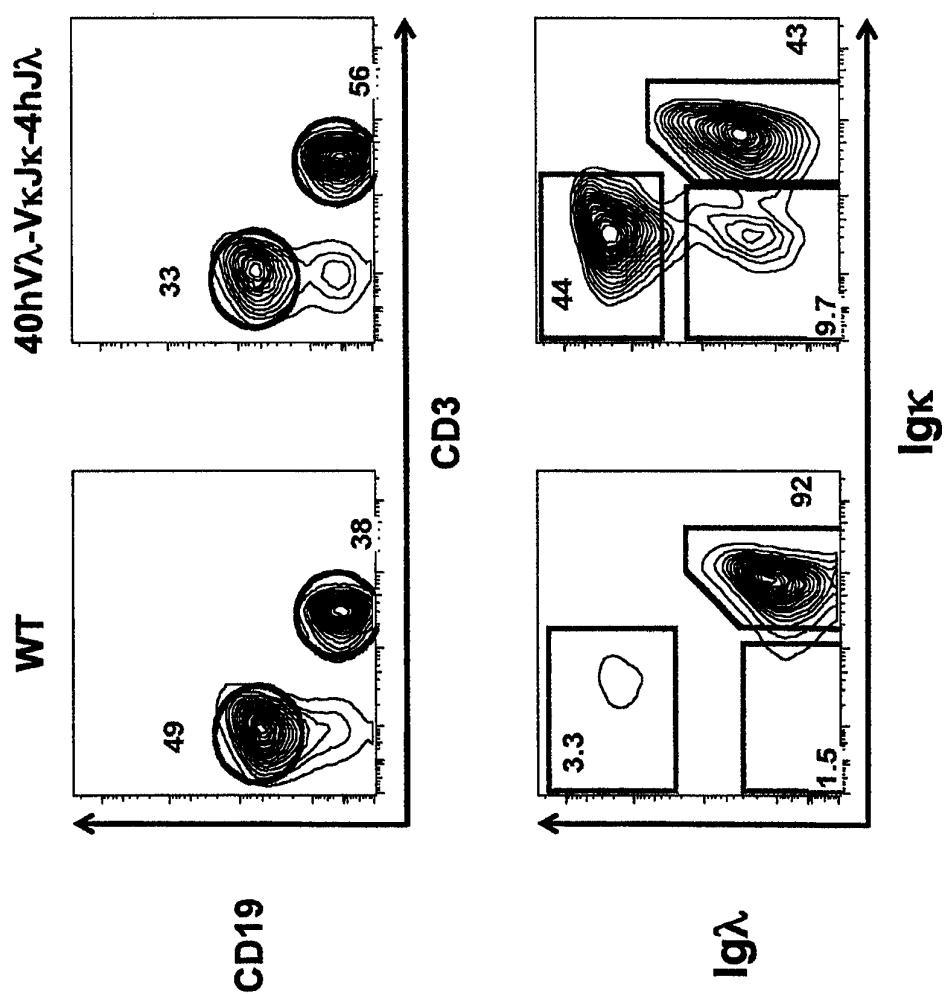


FIG. 9A

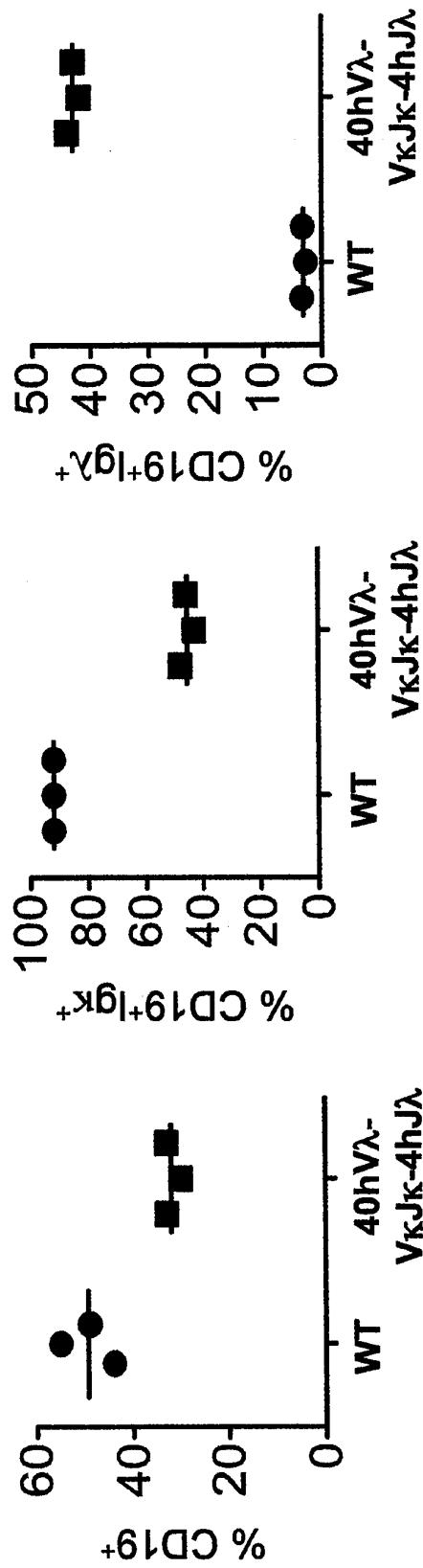


FIG. 9B

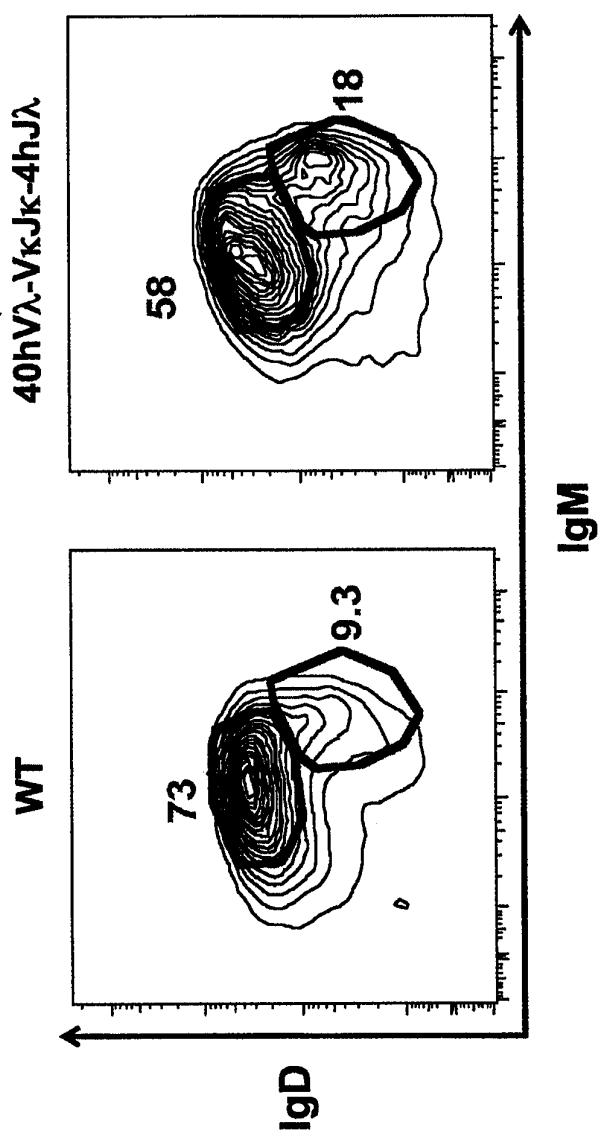


FIG. 9C

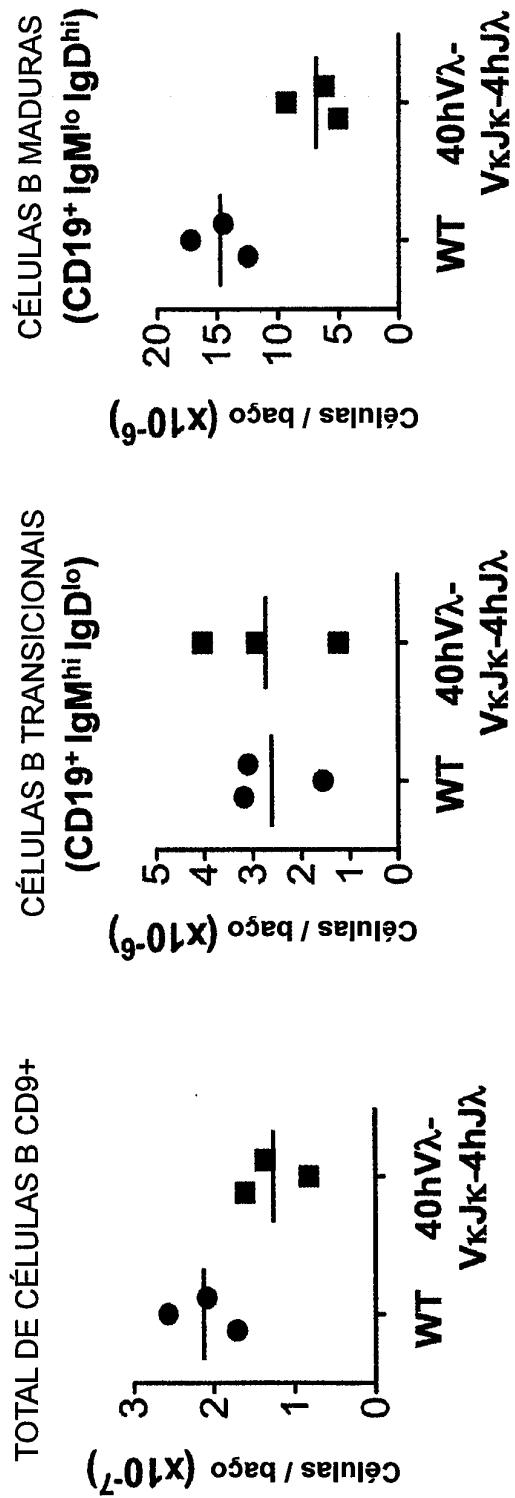


FIG. 9D

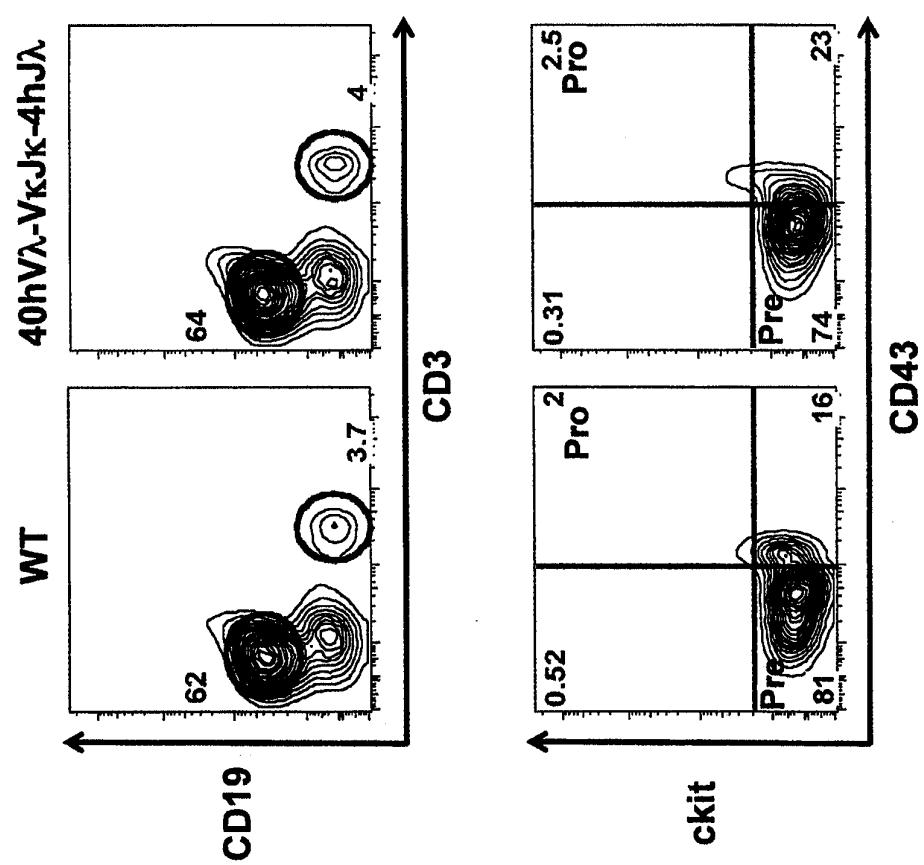


FIG. 10A

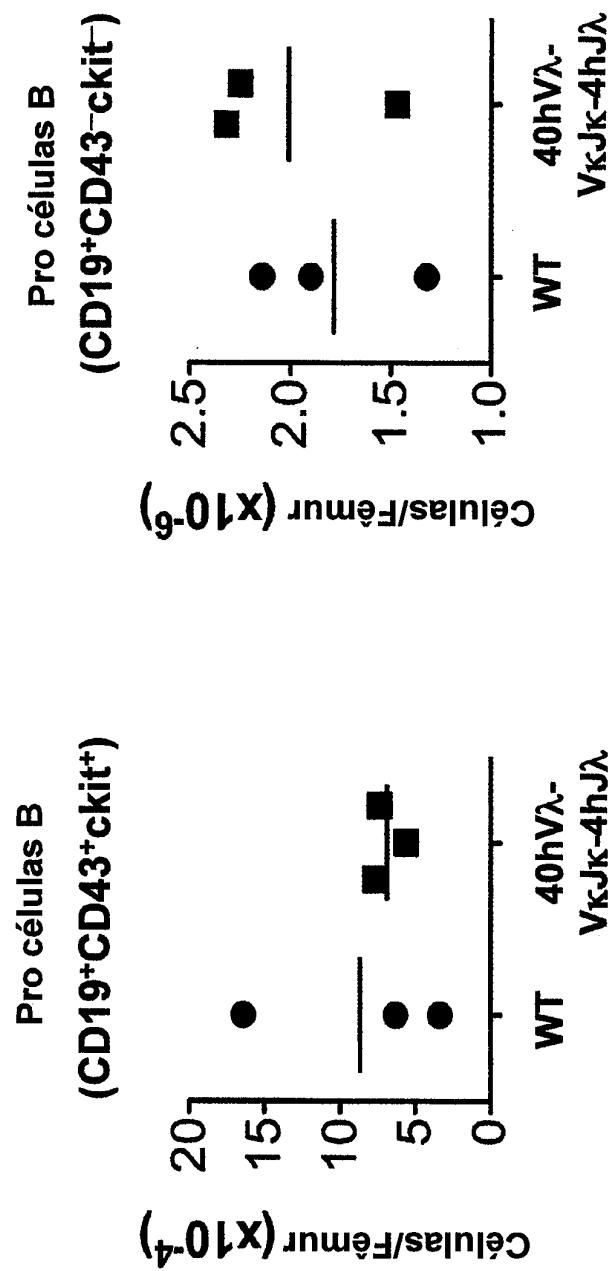


FIG. 10B

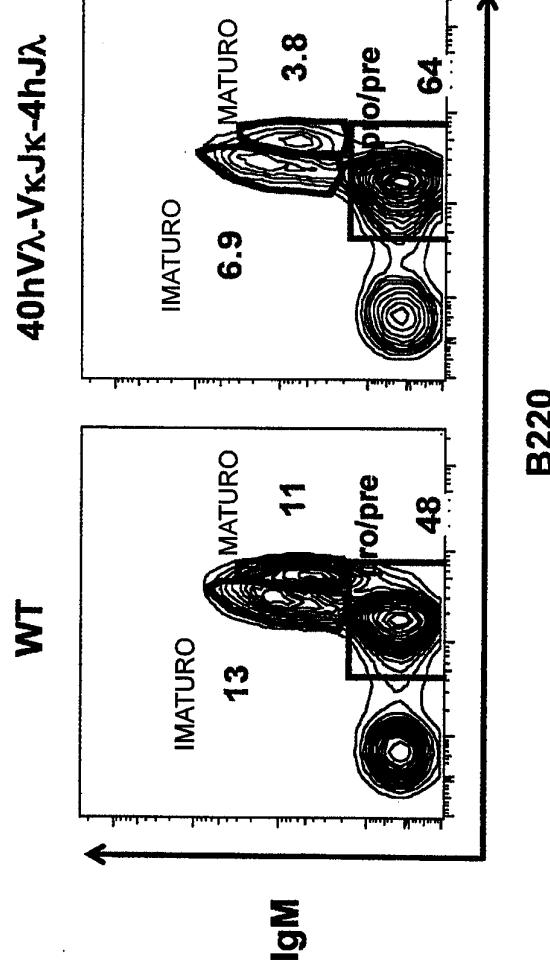


FIG. 10C

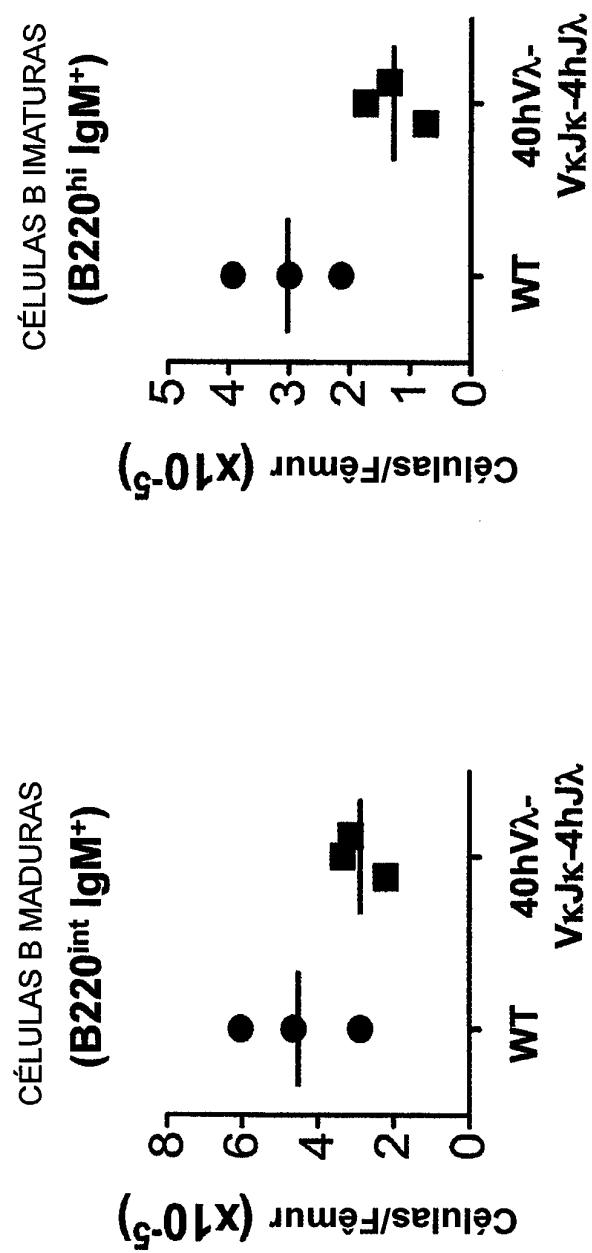


FIG. 10D

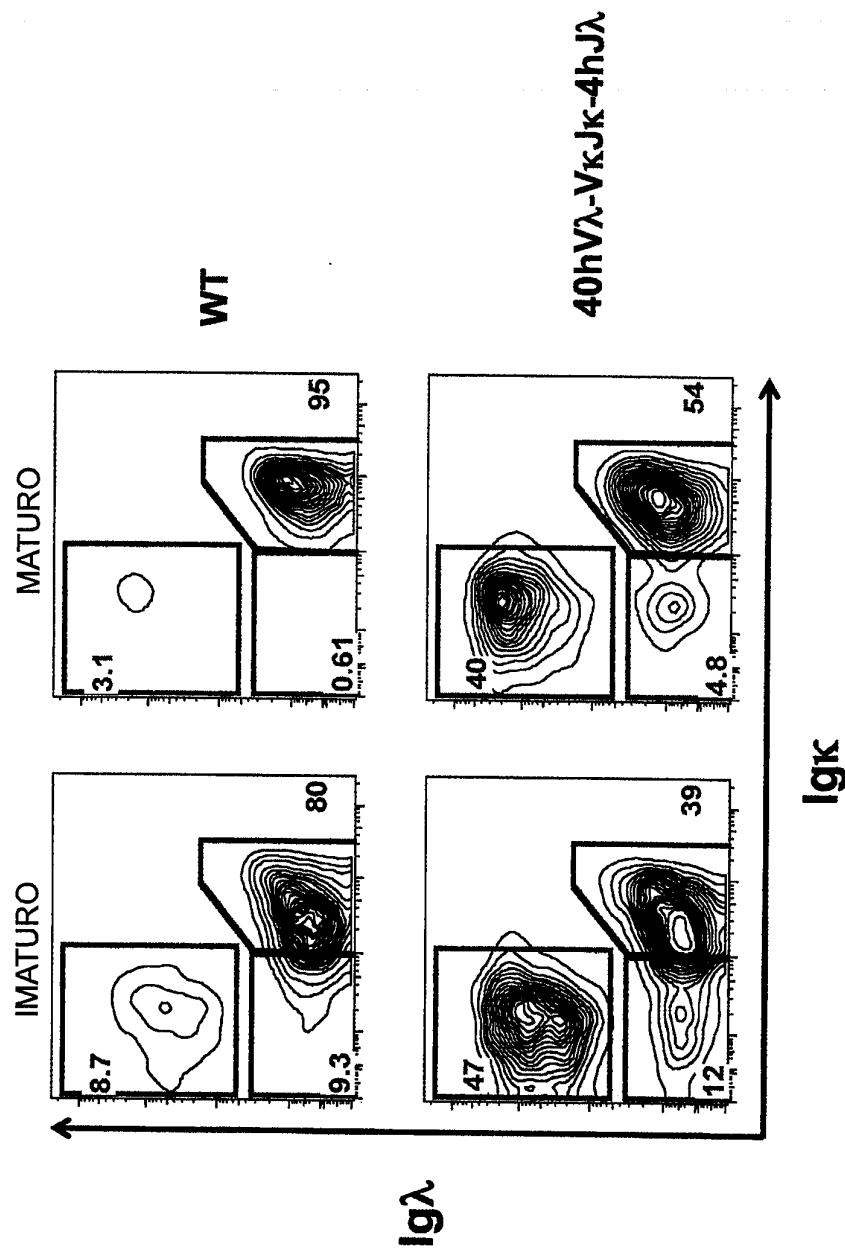


FIG. 10E

3' HUMANA V λ		HUMANA J λ 1		5' CAMUNDONGO C κ	
A6	GCAACAAATT	tcGTCTTGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC		
B6	GCAACAAATT	ATGTCTTGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC		
F6	GCAACAAATT	ATGTCTTGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC		
B7	GCAACAAATT	ATGTCTTGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC		
E7	GCAACAAAT	GTCTTGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC		
F7	GCAACAAATT	ATGTCTTGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC		
C8	GCAACAAATT	ATGTCTTGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC		
E12	CAAGTCCGGTT	9TGTCTTGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC		
1-4	TGAGTGCT	TATGTCTTGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC		
1-20	TGAGTGCG	gcttttttttggaaACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC		
3B4.3	CTGAATGGT	TATGTCTTGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC		
5-8	AGTGGTAAT	CATGTCTTGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC		
5-19	AGTGGGTGCT	TATGTCTTGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC		
1010	AGCAGGCACT	TATGTCTTGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC		
11A1	AGCAGGCT	TATGTCTTGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC		
7A8	GGTGGGTGCT	TATGTCTTGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCC		
3A3	AGTAGGCACT	TATGTCTTGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC		
2-7	AGCAGGCACT	TATGTCTTGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC		
FWR4		F G T G T K V T V L G A D A A P T V S I F			

FIG. 11

	3' HUMANA V _A	HUMANA J _A	5' CAMUNDONGO C _R
5-2	CAGCCTGAGTGGTTC	TGTGTTGGAGGGCACCGGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-5	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCCTCGGAACCTGGGACCAAGGTACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
1-3	CAGCCTGAGTGGT	GCTGTTCCGAGGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4B-1	CAGCCTGAGTGGTC	GGGTGTTCCGGGGAGGACCAAGGTACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
3B-5	CAGCAGGACTGC	TGTGTTCCGAGGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
7A-1	CAGCAGTGGTAAAT	GCTGTTCCGAGGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-1	CAGCAGTGGTAAATCATAG	GTTGTTCCGGGGAGGACCAAGGTACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4A-1	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
11A-1	CAGCAGCGCT	GTGGTATTGGGGAGGACCAAGGTACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-7	CTACTATGGTGGTCTC	GGGTGTTCCGGGGAGGACCAAGGTACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-4	CTCTCTATAGGGTGTG	GTATTGGGGAGGACCAAGGTACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-3	GAGGAAACTTGTTGT	CTGTGTTCCGGGGAGGACCAAGGTACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
FWR4		F G G G T K L T V L G A D A A P T V S I	

FIG. 12

3' HUMANA λ		HUMANA λ 1		5' CAMUNDONGO λ 2	
2D1	GCAGGCAGCAACAATTta	actCTTGGAACTGGGACCAAGGTACCGGTCTCTAG		GTCAAGCCCAAGTCCACTCCCACTCTC	
2D9	GACAGCAGTGGTAATCAT	TATGTCCTTGGAACTGGGACCAAGGTACCGGTCTCTAG		GTCAAGCCCAAGTCCACTCCCACTCTC	
3E15	GACAGCAGCACTGCC	GTCTTGGAACTGGGACCAAGGTACCGGTCTCTAG		GTCAAGCCCAAGTCCACTCCCACTCTC	
FWR4					
		F G T G T K V T V L G		O P K S T P T L	

FIG. 13