

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 942**

51 Int. Cl.:
A01K 67/027 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04013481 .9**
96 Fecha de presentación: **03.12.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **1500329**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.01.2005**

54 Título: **Anticuerpos humanos que se unen específicamente al TNF alfa**

30 Prioridad:
03.12.1996 US 759620

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2012

73 Titular/es:
Amgen Fremont Inc.
6701 Kaiser Drive
Fremont, CA 94555, US

72 Inventor/es:
Green, Larry;
Jakobovits, Aya;
Klapholz, Sue;
Kucherlapati, Rajau y
Mendez, Michael

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

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

ES 2 384 942 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanos que se unen específicamente al TNF alfa

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos humanos que se unen específicamente al TNF alfa.

10 Antecedentes de la tecnología

La capacidad de clonar y reconstruir loci humanos del tamaño de megabases en los YAC (Yeast Artificial Chromosome, cromosomas artificiales de levaduras) e introducirlos en la línea germinal de ratón proporciona un enfoque poderoso para dilucidar los componentes funcionales de loci muy grandes o toscamente mapeados, así como para generar modelos útiles de enfermedades humanas. Además, la utilización de dicha tecnología para la sustitución de loci de ratón con sus equivalentes humanos proporcionaría una comprensión excepcional de la expresión y regulación de productos génicos humanos durante el desarrollo, de su comunicación con otros sistemas y de su implicación en la inducción y la evolución de enfermedades.

Una aplicación práctica importante de dicha estrategia es la "humanización" del sistema inmune humoral de ratón. La introducción de loci de inmunoglobulinas humanas (Ig) en ratones en los que se han inactivado los genes de Ig endógenos ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos que subyacen a la expresión programada y al ensamblaje de anticuerpos, así como su papel en el desarrollo de células B. Además, dicha estrategia proporcionará una fuente ideal para la producción de anticuerpos monoclonales (Mab) completamente humanos, un hito importante para hacer realidad la promesa de una terapia de anticuerpos en enfermedades humanas. Se espera que los anticuerpos completamente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a Mab de ratón o derivatizados de ratón y, por lo tanto, aumenten la eficacia y la seguridad de los anticuerpos administrados. Puede esperarse que el uso de anticuerpos completamente humanos proporcione una ventaja sustancial en el tratamiento de enfermedades humanas crónicas y recurrentes, tales como inflamación, autoinmunidad y cáncer, que requieren administraciones de anticuerpos repetidas.

Un enfoque con este objetivo consistió en generar por ingeniería genética cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los loci de Ig humanas, esperando que dichos ratones produjeran un gran repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Los grandes fragmentos de Ig humanas conservarían la muy variable diversidad génica, así como la regulación apropiada de la producción y expresión de anticuerpos. Aprovechando la maquinaria del ratón para la diversificación y selección de anticuerpos y la ausencia de tolerancia inmunológica hacia proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducido en estas cepas de ratón produciría anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluyendo antígenos humanos. Usando la tecnología de hibridomas, se podrían producir y seleccionar fácilmente Mab humanos específicos de antígeno con la especificidad deseada.

Esta estrategia general se demostró en relación con la generación de las primeras cepas de XenoMouse™, como se publicaron en 1994. Véase Green et al. *Nature Genetics* 7: 13-21 (1994). Las cepas de XenoMouse™ se generaron por ingeniería genética con fragmentos de configuración de línea germinal de los loci de cadena pesada y de los loci de cadena ligera kappa humanos del tamaño de 250 kb y 190 kb, respectivamente, que contenían las secuencias de las regiones variable y constante del núcleo. *Ídem*. Los cromosomas artificiales de levaduras (YAC) que contienen Ig humanas demostraron ser compatibles con el sistema del ratón tanto para la reorganización como para la expresión de anticuerpos y eran capaces de sustituir a los genes de Ig de ratón inactivados. Esto se demostró por su capacidad para inducir el desarrollo de células B y para producir un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos completamente humanos y para generar Mab humanos específicos de antígeno. Estos resultados también sugerían que la introducción de mayores partes de los loci de Ig humanas que contenían un mayor número de genes V, elementos reguladores adicionales y regiones constantes de Ig humanas podían recapitular sustancialmente el repertorio completo que es característico de la respuesta humoral humana a la infección y la inmunización.

Dicho enfoque se analiza y se describe adicionalmente en las solicitudes de patente de EEUU de nº de serie 07/466.008, presentada el 12 de enero de 1990, 07/610.515, presentada el 8 de noviembre de 1990, 07/919.297, presentada el 24 de julio de 1992, 07/922.649, presentada el 30 de julio de 1992, 08/031.801, presentada el 15 de marzo de 1993, 08/112.848, presentada el 27 de agosto de 1993, 08/234.145, presentada el 28 de abril de 1994, 08/376.279, presentada el 20 de enero de 1995, 08/430.938, presentada el 27 de abril de 1995, 08/464.584, presentada el 5 de junio de 1995, 08/464.582, presentada el 5 de junio de 1995, 08/463.191, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462.837, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.853, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.857, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.859, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462.513, presentada el 5 de junio de 1995 y 08/724.752, presentada el 2 de octubre de 1996. Véanse también la patente europea nº EP 0 463 151 B1, concedida y publicada el 12 de junio 1996, la solicitud de patente internacional nº WO 94/02602, publicada el 3 de febrero de 1994, la solicitud de patente internacional nº WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996 y la solicitud PCT nº PCT/US96/05928, presentada el 29 de abril de 1996. El documento WO 96/33735 desvela anticuerpos humanos producidos por la administración de un antígeno a un Xenorató.

En un enfoque alternativo, otros, incluyendo GenPharm International, Inc., han utilizado un enfoque de "minilocus". En el enfoque de minilocus, se mimetiza un locus de Ig exógeno a través de la inclusión de trozos (genes individuales) del locus de Ig. Por lo tanto, para la inserción en un animal, en una construcción se forman uno o más genes V_H , uno o más genes D_H , uno o más genes J_H , una región constante μ y una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma). Este enfoque se describe en la patente de EEUU nº 5.545.807 de Surani et al. y en las patentes de EEUU nº 5.545.806 y 5.625.825, ambas de Lonberg y Kay, y en las solicitudes de patente de EEUU de GenPharm International de nº de serie 07/574.748, presentada el 29 de agosto de 1990, 07/575.962, presentada el 31 de agosto de 1990, 07/810.279, presentada el 17 de diciembre de 1991, 07/853.408, presentada el 18 de marzo de 1992, 07/904.068, presentada el 23 de junio de 1992, 07/990.860, presentada el 16 de diciembre de 1992, 08/053.131, presentada el 26 de abril de 1993, 08/096.762, presentada el 22 de julio de 1993, 08/155.301, presentada el 18 de noviembre de 1993, 08/161.739, presentada el 3 de diciembre de 1993, 08/165.699, presentada el 10 de diciembre de 1993, 08/209.741, presentada el 9 de marzo de 1994. Véanse también las solicitudes de patente internacional nº WO 94/25585, publicada el 10 de noviembre de 1994, WO 93/12227, publicada el 24 de junio de 1993, WO 92/22645, publicada el 23 de diciembre de 1992 y WO 92/03918, publicada el 19 de marzo de 1992. Véanse además Taylor et al., 1992, Chen et al., 1993, Tuailon et al., 1993, Choi et al., 1993, Lonberg et al., (1994), Taylor et al., (1994) y Tuailon et al., (1995).

Los inventores de Surani et al., citada anteriormente y cedida al Medical Research Counsel (el "MRC"), produjeron un ratón transgénico que poseía un locus de Ig mediante el uso del enfoque del minilocus. Los inventores del trabajo de GenPharm International, citado anteriormente, Lonberg y Kay, siguiendo el ejemplo de los presentes inventores, propusieron la inactivación del locus de Ig de ratón endógeno junto con una duplicación sustancial del trabajo de Surani et al.

Una ventaja del enfoque del minilocus es la rapidez con la que pueden generarse construcciones que incluyan partes del locus de Ig e introducirse en animales. Sin embargo, en igual medida, una desventaja significativa del enfoque de minilocus es que, en teoría, se introduce una diversidad insuficiente a través de la inclusión de un pequeño número de genes V, D y J. De hecho, el trabajo publicado parece apoyar esta preocupación. El desarrollo de células B y la producción de anticuerpos de los animales producidos usando el enfoque del minilocus parecían atrofiados. Por lo tanto, los presentes inventores han insistido sistemáticamente en la introducción de grandes partes del locus de Ig para conseguir una mayor diversidad y en un intento de reconstituir el repertorio inmune de los animales.

Por consiguiente, sería deseable proporcionar animales transgénicos que contengan secuencias y una configuración de línea germinal más completa del locus de Ig humana. Además, sería deseable proporcionar dicho locus en un fondo *knock out* de Ig endógena.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a los siguientes puntos:

1. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al $TNF\alpha$ humano, o una parte de unión al antígeno de dicho anticuerpo, en el que dicho anticuerpo:

- (a) reduce la unión del $TNF\alpha$ humano a un receptor del $TNF\alpha$ humano;
- (b) comprende una cadena pesada de IgG2 humana;
- (c) comprende una cadena ligera kappa humana; y
- (d) se une al $TNF\alpha$ humano con:

- (i) una KD menor de 2×10^{-10} M;
- (ii) una K_a mayor de $0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$; o
- (iii) una KD menor de 2×10^{-10} M y una K_a mayor de $0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$.

2. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con el punto 1, en el que el anticuerpo o la parte de unión al antígeno se une al $TNF\alpha$ con una KD menor de 2×10^{-10} M.

3. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con el punto 1, en el que el anticuerpo o la parte de unión al antígeno se une al $TNF\alpha$ con una K_a mayor de $0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$.

4. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con el punto 3, en el que el anticuerpo o la parte de unión al antígeno se une al $TNF\alpha$ con una KD de $1,89\text{-}8,06 \times 10^{-10}$ M.

5. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con el punto 3, en el que el anticuerpo o la parte de unión al antígeno se une al $TNF\alpha$ con una K_A de $1,2\text{-}5,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.

6. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con el punto 3, en el que el anticuerpo o la parte de unión al antígeno se une al $\text{TNF}\alpha$ con una K_A de $1,2\text{-}3,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.
- 5 7. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con el punto 1, en el que el anticuerpo o la parte de unión al antígeno se une al $\text{TNF}\alpha$ con una K_D menor de $2 \times 10^{-10} \text{ M}$ y una K_a mayor de $0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$.
8. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de los puntos 3-7, en el que el anticuerpo o la parte de unión al antígeno se une al $\text{TNF}\alpha$ con una K_a de $1,6\text{-}2,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{S}^{-1}$.
- 10 9. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de los puntos 3-7, en el que el anticuerpo o la parte de unión al antígeno se une al $\text{TNF}\alpha$ con una K_a mayor de $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$.
- 15 10. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-9, en el dicho anticuerpo es monoclonal.
- 20 11. El uso del anticuerpo o la parte de unión al antígeno de cualquiera de los puntos 1 a 10 en la preparación de un medicamento.
- 20 12. El uso del anticuerpo o la parte de unión al antígeno de cualquiera de los puntos 1 a 10 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad humana crónica o recurrente, tal como inflamación, autoinmunidad y cáncer.
- 25 13. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de cualquiera de los puntos 1 a 10 para su uso como un medicamento.
- 25 14. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de cualquiera de los puntos 1 a 10 para su uso en el tratamiento de una enfermedad humana crónica o recurrente tal como inflamación, autoinmunidad y cáncer.
- 30 15. Un método para reducir la unión del $\text{TNF}\alpha$ humano a un receptor del $\text{TNF}\alpha$ humano que comprende la etapa de poner en contacto el $\text{TNF}\alpha$ humano con el anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 10.
- 35 16. Un método para producir el anticuerpo humano aislado de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 10, que comprende las etapas de:
 - (a) inmunizar un ratón transgénico capaz de expresar un anticuerpo completamente humano contra un antígeno de interés con el $\text{TNF}\alpha$ humano; y
 - (b) aislar el anticuerpo humano.
- 40 17. Una célula que exprese anticuerpos derivados de un ratón transgénico inmunizado por el método de acuerdo con el punto 16.
- 45 18. La célula que expresa anticuerpos de acuerdo con el apartado 17, en el que dicha célula es una célula inmortalizada.
- 50 19. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en:
 - (a) la cadena pesada del anticuerpo humano de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-10;
 - (b) la cadena ligera del anticuerpo humano de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-10; y
 - (c) una parte de unión al antígeno de (a) o (b).
- 60 20. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con el punto 19.
- 55 21. Una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con el punto 19 o el vector de acuerdo con el punto 20.
- 65 22. La célula hospedadora de acuerdo con el punto 21, en el que la célula hospedadora comprende:
 - (a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-10 o una parte de unión al antígeno del mismo; y
 - (b) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-10 o una parte de unión al antígeno del mismo.

23. Un método para producir el anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-10, que comprende las etapas de cultivar una célula hospedadora de acuerdo con el punto 22 y recuperar el anticuerpo.

5 Breve descripción de las figuras dibujadas

La **Figura 1** es una representación esquemática de los YAC de los loci de la cadena pesada humana y de la cadena ligera kappa humana reconstruidos introducidos en ratones preferidos descritos en la presente invención. Los YAC que incluían los loci de la cadena pesada humana (1H, 2H, 3H y 4H) y la cadena ligera kappa humana proximal (1K, 2K y 3K) se clonaron a partir de genotecas humanas de YAC. Se indican las localizaciones de los diferentes YAC con respecto a los loci de Ig humanas (tomadas de Cook y Tomlinson, 1995, y Cox et al., 1994), sus tamaños y las secuencias de no-Ig (no se muestran a escala). Los YAC se recombinaron en levaduras en un procedimiento de dos etapas (véase el apartado Materiales y Métodos) para reconstruir los YAC de las cadenas pesada y ligera kappa humanas. Además, se modificó el yH2, el YAC que contenía la cadena pesada humana, con una secuencia génica γ_2 humana. El yK2 era el YAC que contenía la cadena ligera kappa humana. Se indican los elementos del vector YAC: telómero $\blacktriangle$, centrómero $\bullet$, marcadores de selección de mamíferos (HPRT, Neo) y de levaduras (TRP1, ADE2, LYS2, LEU2, URA3, HIS3) en los brazos del vector YAC. Los segmentos V_H se clasifican como genes con fases de lectura abierta $\bullet$, pseudogenes $\square$ y genes no secuenciados $\circ$. Los segmentos V_K se clasifican como genes con fases de lectura abierta $\bullet$ y pseudogenes $\square$. Se señalan con (*) los genes V que se ha visto que utiliza el XenoMouse II. La región génica V_H contenida en yH2 se señala con flechas.

La **Figura 2** es una serie de análisis de transferencia de Southern y caracterizaciones del YAC de la cadena pesada humana, yH2, integrado en células ES y en cepas de XenoMouse. La Figura 2a es una serie de análisis de transferencia de Southern de ADN (2 μ g) digerido con EcoRI (a,c) y BamHI (b,d,e) preparado a partir de la línea celular de linfoblastos B inmortalizados CGM1, procedente de la fuente de genoteca de YAC de la Universidad de Washington (Brownstein et al., 1989), YAC yH2 (0,5 μ g de YAC añadidos a 2 μ g de ADN 3B1), E14TG.3B1 no modificadas (3B1) y líneas celulares ES que contienen yH2: L10, J9.2, L18, L17 y J17. Las sondas que se usaron para la transferencia eran V_{H1} (a), D_H (b) [el fragmento de 18 kb en el carril de CGM1 representa los segmentos D en el cromosoma 16], V_{H3} (c), C_μ (d) y J_H (e) humanas. La Figura 2b es una serie de análisis de transferencia de Southern de ADN (10 μ g) digerido con EcoRI (a-b) y BamHI (c-d) que se prepararon a partir de colas de ratones de tipo silvestre (TS, 129xB57BL/6J), XM2A-1 y XM2A-2 (2 descendencias individuales) o a partir de las líneas celulares ES parentales que contienen yH2 L10 (cargado en una cantidad ligeramente inferior con respecto a otras muestras), J9.2 y de la línea celular ES que contiene yK2 J23.1. Las sondas que se usaron eran V_{H1} (a) y V_{H4} (b) humanas, γ_2 humana (c) y potenciador 3' de ratón (d, la banda de 5 kb representa el fragmento potenciador 3' endógeno de ratón). Se indican los tamaños de los fragmentos de los marcadores de peso molecular (en kb).

La **Figura 3** es una serie de análisis de transferencia de Southern que caracterizan al YAC de la cadena ligera kappa humana, yK2, integrado en células ES y en cepas de XenoMouse 2A. La Figura 2a es una serie de análisis de transferencia de Southern de ADN (2 μ g) digerido con EcoRI (a, c, d) y BamHI (b, e) preparado a partir de la línea celular CGM1 (Brownstein et al., 1998, anteriormente), YAC yK2 (0,5 μ g de ADN de YAC añadidos a 2 μ g de ADN de 3B1), E14TG.3B1 no modificadas (3B1) y de las líneas celulares ES que contienen yK2: J23.1 y J23.7. Las sondas que se usaron eran V_K (a), K_δ (b), V_{KII} (c), V_{KIII} (d) y C_K (e) humanas. La Figura 2b es una serie de análisis de transferencia de Southern de ADN (2 μ g) digerido con EcoRI que se preparó a partir de colas de ratones de tipo silvestre (TS, 129xB6), XM2A-1 y XM2A-2 (2 descendencias individuales) o a partir de las líneas celulares ES parentales que contienen yH2 L10 (cargado en una cantidad ligeramente inferior con respecto a otras muestras), J9.2 y de la línea celular ES que contiene yK2 J23.1. Las sondas que se usaron eran V_{KI} (a), V_{KIV} (b), V_{KIV} (c) humanas y potenciador 3' de ratón (d). Se indican los tamaños de los fragmentos de los marcadores de peso molecular (en kb).

La **Figura 4** muestra la reconstitución de células B y la expresión en la superficie de cadenas μ , δ y κ humanas en células B obtenidas de XenoMouse y muestra análisis de citometría de flujo de linfocitos de sangre periférica (Fig. 4a) y bazo (Fig. 4b) de ratones de tipo silvestre (TS), ratones con una doble inactivación (DI) y cepas de XenoMouse 2A-1 y 2A-2 (XM2A-1 y XM2A-2). Se realizó un análisis de citometría de flujo de cuatro colores usando anticuerpos contra el marcador B220, específico de células B, junto con anti μ , δ y κ humanas o anti μ , δ , κ o λ de ratón. El porcentaje de células teñidas positivamente se muestra en cada cuadrante. El aislamiento y la tinción de las células se realizaron como se describe en el apartado Materiales y métodos. Después de la primera separación de poblaciones B220 $^+$ en la región indicada se determinaron poblaciones celulares de κ' humana y λ' de ratón. Después de la primera separación de células B220 $^+$ se determinaron poblaciones de células μ' y δ' . Dentro de una región o cuadrante se indica el porcentaje de células positivas. Los perfiles de FACS que se muestran son representativos de varios experimentos realizados en cada una de las cepas.

La **Figura 5** muestran que los anticuerpos humanos obtenidos de XenoMouse bloquean la unión de sus antígenos específicos a las células. La Figura 5a muestra la inhibición de la unión de IL-8 marcada con [I^{125}] a neutrófilos humanos mediante el anticuerpo de ratón anti-IL-8 humana (R&D Systems) ($\square$) y los Mab completamente humanos D1.1 ($\diamond$), K2.2 ($\bullet$), K4.2 ($\blacktriangle$) y K4.3 ($\blacktriangledown$). La unión de fondo de la IL-8 marcada con [I^{125}] en ausencia de anticuerpos fue de 2657 cpm. La Figura 5b muestra la inhibición del EGF marcado con

[I¹²⁵] contra sus receptores en células A431 mediante anticuerpos de ratón anti-EGFR humano 225 y 528 (□ y ∇, respectivamente; Calbiochem) y los anticuerpos completamente humanos E1.1 (●), E2.4 (▲), E2.5 (▼) y E2.11 (◆). La unión de fondo del [I¹²⁵]EGF en ausencia de anticuerpos fue de 1060 cpm. La Figura 5c muestra la inhibición de la unión del TNF-α marcado con [I¹²⁵] contra sus receptores en células U937 mediante el anticuerpo de ratón anti-TNF-α humano (R&D Systems) (□) y los Mab completamente humanos T22.1 (◆), T22.4 (●), T22.8 (▲) y T22.9 (■). La unión de fondo del [I¹²⁵]TNF-α en ausencia de anticuerpos fue de 4010 cpm. El control, anticuerpo IgG₂ de mieloma humano (⊠).

La **Figura 6** muestra el repertorio y la hipermutación somática en los Mab completamente humanos derivados de XenoMouse. Se indican las secuencias de aminoácidos predichas de cuatro Mab IgG₂κ humanos anti-IL-8 (Fig. 6a) y cuatro anti-EGFR (Fig. 6b), divididas en CDR1, CDR2 y CDR3 y las regiones constantes, C_H2 y C_κ. Se indican los genes D y J de cada anticuerpo. En negrita se indican las sustituciones de aminoácidos de las secuencias de la línea germinal.

La **Figura 7** es un diagrama esquemático del genoma de la cadena pesada humana y del genoma de la cadena ligera kappa humana.

La **Figura 8** es otro diagrama esquemático que muestra la construcción del YAC yH2 (de la cadena pesada humana).

La **Figura 9** es otro diagrama esquemático que muestra la construcción del YAC yK2 (de la cadena ligera kappa humana).

La **Figura 10** es otro diagrama esquemático que muestra la construcción del YAC yK2 (de la cadena ligera kappa humana).

La **Figura 11** muestra una serie de análisis de transferencia de Southern que demuestra la integración intacta del YAC yH2 (de la cadena pesada humana) en células ES y en el genoma de ratón. Con respecto a la Figura 2 se proporciona una discusión detallada.

La **Figura 12** muestra una serie de análisis de transferencia de Southern que demuestra la integración intacta del YAC yK2 (de la cadena ligera kappa humana) en células ES y en el genoma de ratón. Con respecto a la Figura 3 se proporciona una discusión detallada.

La **Figura 13** muestra la reconstitución de células B y la expresión en la superficie de cadenas μ, δ y κ humanas y de cadenas λ de ratón en células B derivadas de XenoMouse y muestra análisis de citometría de flujo de sangre periférica. Con respecto a la Figura 4 se proporcionan detalles adicionales.

La **Figura 14** muestra los niveles de producción de anticuerpos humanos por cepas de XenoMouse II en comparación con la producción de anticuerpos murinos por ratones de tipo silvestre.

La **Figura 15** es un análisis del repertorio de transcritos de la cadena pesada humana expresados en cepas de XenoMouse II.

La **Figura 16** es un análisis del repertorio de transcritos de la cadena ligera kappa humana expresados en cepas de XenoMouse II.

La **Figura 17** es otra representación de la diversa utilización de genes V_H y V_κ humanos que se ha observado que utilizan cepas de XenoMouse II.

La **Figura 18** muestra los títulos de producción de anticuerpo humano en cepas de XenoMouse II.

La **Figura 19** es una representación de la utilización génica de anticuerpos anti-IL-8 derivados de cepas de XenoMouse II.

La **Figura 20** muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpos anti-IL-8 derivados de cepas de XenoMouse II.

La **Figura 21** muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera kappa de anticuerpos anti-IL-8 derivados de cepas de XenoMouse II.

La **Figura 22** muestra el bloqueo de la unión de IL-8 a neutrófilos humanos por anticuerpos humanos anti-IL-8 derivados de cepas de XenoMouse II.

La **Figura 23** muestra la inhibición de la expresión de CD11b en neutrófilos humanos por anticuerpos humanos anti-IL-8 derivados de cepas de XenoMouse II.

La **Figura 24** muestra la inhibición del flujo de entrada de calcio inducido por IL-8 por anticuerpos humanos anti-IL-8 derivados de cepas de XenoMouse II.

La **Figura 25** muestra la inhibición de la quimiotaxis de RB/293 por IL-8 mediante anticuerpos humanos anti-IL-8 derivados de cepas de XenoMouse II.

La **Figura 26** es un diagrama esquemático de un modelo de conejo de inflamación de la piel inducida por IL-8 humana.

La **Figura 27** muestra la inhibición de la inflamación de la piel inducida por IL-8 humana en el modelo de conejo de la Figura 26 por anticuerpos humanos anti-IL-8 derivados de cepas de XenoMouse II.

La **Figura 28** muestra la inhibición de la angiogénesis de células endoteliales en un modelo del bolsillo corneal en ratas mediante anticuerpos humanos anti-IL-8 derivados de cepas de XenoMouse II.

La **Figura 29** es una representación de la utilización génica de anticuerpos humanos anti-EGFR derivados de cepas de XenoMouse II.

La **Figura 30** muestra secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpos humanos anti-EGFR derivados de cepas de XenoMouse II.

La **Figura 31** muestra el bloqueo de la unión del EGF a células A431 por anticuerpos humanos anti-EGFR derivados de cepas de XenoMouse II.

La **Figura 32** muestra la inhibición de la unión del EGF a células SW948 por anticuerpos humanos anti-EGFR

derivados de cepas de XenoMouse II.

La **Figura 33** muestra que los anticuerpos humanos anti-EGFR derivados de cepas de XenoMouse II inhiben el crecimiento de células SW948 *in vitro*.

La **Figura 34** muestra la inhibición de la unión del TNF- α a células U937 usando anticuerpos humanos anti-TNF- α derivados de cepas de XenoMouse II.

La **Figura 35** muestra secuencias de aminoácidos de la cadena ligera kappa de anticuerpos humanos anti-EGFR derivados de cepas de XenoMouse II.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

En este documento se describe la generación y la caracterización de diversas cepas de ratones que contienen sustancialmente loci de Ig humanas del tamaño de megabases de configuración de línea germinal. Se proporciona la primera demostración de una reconstrucción de los grandes y complejos loci de las Ig humanas en los YAC y la introducción con éxito de los YAC del tamaño de megabases en ratones para reemplazar funcionalmente a los loci de ratón correspondientes.

Cepas de ratón

En este documento se describen y/o utilizan las siguientes cepas de ratón:

Cepa con doble inactivación (DI): La cepa de ratones DI son ratones que no producen Ig endógenas funcionales de ratón. Preferentemente, los ratones DI poseen una región J_H de ratón inactivada y una región C_K de ratón inactivada. La construcción de esta cepa se describe ampliamente en otro sitio. Por ejemplo, las técnicas utilizadas para la generación de las cepas DI se describen con detalle en las solicitudes de patente de EEUU de n° de serie 07/466.008, presentada el 12 de enero de 1990, 07/610.515, presentada el 8 de noviembre de 1990, 07/919.297, presentada el 24 de julio de 1992, 08/031.801, presentada el 15 de marzo de 1993, 08/112.848, presentada el 27 de agosto de 1993, 08/234.145, presentada el 28 de abril de 1994, 08/724.752, presentada el 2 de octubre de 1996. Véanse también la patente europea n° EP 0 463 151 B1, concedida y publicada el 12 de junio 1996, la solicitud de patente internacional n° WO 94/02602, publicada el 3 de febrero de 1994, la solicitud de patente internacional n° WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996 y la solicitud PCT n° PCT/US96/05928, presentada el 29 de abril de 1996. Se ha observado y publicado que los ratones DI poseen un desarrollo de células B muy inmaduro. Los ratones no producen células B maduras, solamente células pro-B.

Cepa XenoMouse I: El diseño, la construcción y el análisis de la cepa XenoMouse I se analiza con detalle en Green et al., *Nature Genetics*, 7: 13-21 (1994). Dichos ratones producían anticuerpos IgM κ contra un fondo DI. Los ratones demostraron una función de células B mejorada en comparación con la cepa DI de ratones que presentaban un escaso o ningún desarrollo de células B. Aunque las cepas de XenoMouse I de ratones eran capaces de producir una respuesta inmune considerable frente a una exposición antigénica, parecían ineficaces en su producción de células B y poseían una respuesta limitada contra antígenos diferentes, que aparentemente estaba relacionada con su limitado repertorio de genes V.

Cepa L6: La cepa L6 consiste en ratones que producen anticuerpos IgM κ contra un fondo DI de Ig endógena de ratón. Los ratones L6 contienen una cadena pesada humana insertada y una cadena ligera kappa humana insertada. La cepa L6 se genera mediante el cruce de un ratón que contiene un inserto de la cadena pesada contra un fondo con una doble inactivación (L6H) y un ratón que tiene un inserto de la cadena ligera kappa contra un fondo con una doble inactivación (L6L). El inserto de la cadena pesada comprende un inserto de ADN humano intacto de aproximadamente 970 kb de un YAC que contiene aproximadamente 66 segmentos V_H, que comienzan en el V_H6-1 y terminan en el V_H3-65, e incluye los grupos principales de genes D (aproximadamente 32), genes J_H (6), el potenciador intrónico (Em), C μ y hasta aproximadamente 25 kb por delante de C δ en una configuración de línea germinal. El inserto de la cadena ligera comprende un inserto de ADN humano intacto de aproximadamente 800 kb de un YAC que contiene aproximadamente 32 genes V_K que comienzan en V_K-B3 y terminan en V_K-Op11. El inserto de 800 kb contiene una delección de aproximadamente 100 kb, que comienza en el V_K-Lp-13 y termina en el V_K-Lp-5. Sin embargo, el ADN está en una configuración de línea germinal desde V_K-Lp-13 hasta 100 kb por delante de V_K-Op-1 y también contiene los genes J_K, los potenciadores 3' e intrónicos, el gen constante C κ y Kde. Los ratones L6H y L6L han demostrado tener acceso al abanico completo de los genes variables incorporados en su genoma. Se espera que los ratones L6 accedan de forma similar al abanico completo de genes variables en su genoma. Por lo tanto, los ratones L6 presentarán una expresión predominante de cadena ligera kappa humana, una gran población de células B maduras y niveles normales de anticuerpos IgM humanos. Dichos ratones producirán una respuesta enérgica de anticuerpos humanos contra múltiples inmunógenos, produciendo en última instancia Mab completamente humanos específicos de antígeno con afinidades subnanomolares.

Cepa XenoMouse IIa: Los ratones XenoMouse IIa representan la segunda generación de cepas XenoMouse™, provistos de loci de Ig humanas del tamaño de megabases de configuración de línea germinal contra un fondo DI, de tal modo que los ratones no producen Ig endógena funcional. Básicamente, los ratones son equivalentes en construcción a los de la cepa L6, pero incluyen además el gen γ 2 humano con sus secuencias reguladoras y de

cambio de clase completas y el potenciador 3' de ratón en cis. Los ratones contienen los loci de una cadena pesada de aproximadamente 1020 kb y de una cadena ligera kappa de aproximadamente 800 kb, reconstruidos en YAC, que incluyen la mayoría de los genes de las regiones variables humanas, incluyendo los genes de la cadena pesada (aproximadamente 66 V_H) y los genes de la cadena ligera kappa (aproximadamente 32 V_K), los genes de la región constante de la cadena pesada humana (μ , δ y γ) y los genes de la región constante kappa (C_K) y todos los elementos reguladores principales identificados. Estos ratones han demostrado tener acceso al abanico completo de los genes variables incorporados en su genoma. Además, presentan un cambio de clase y una hipermutación somática eficaces, una expresión predominante de la cadena ligera kappa humana, una gran población de células B maduras y niveles normales de anticuerpos humanos IgM $_K$ e IgG $_K$. Dichos ratones producen una respuesta enérgica de anticuerpos humanos contra múltiples inmunógenos, incluyendo la IL-8 humana, el receptor del EGF humano (EGFR) y el factor de necrosis tumoral- α humano (TNF- α), produciendo en última instancia Mab completamente humanos específicos de antígeno con afinidades subnanomolares. Este último resultado demuestra de forma concluyente que XenoMouse™ es una fuente excelente para el aislamiento rápido de Mab terapéuticos completamente humanos, de alta afinidad, contra una amplia variedad de antígenos con cualquier especificidad deseada.

Como se apreciará a partir de la introducción anterior, parece que la cepa XenoMouse II experimenta un desarrollo de células B maduras y produce fuertes respuestas inmunes de tipo humano adulto frente a la exposición antigénica. La cepa L6, como se predice a partir de los datos con respecto a los ratones L6L y L6H, también parece experimentar un desarrollo de células B maduras y producir fuertes respuestas inmunes de tipo humano adulto frente a la exposición antigénica. Cuando se comparan ratones DI con cepas de XenoMouse I y se comparan cepas DI y de XenoMouse I con cepas de L6 y de XenoMouse II, se observa un perfil de desarrollo de células B notablemente diferente. Debido a esta diferencia, parece que la cantidad y/o calidad de secuencias de la región variable introducidas en los animales son esenciales en la inducción de la maduración y el desarrollo de células B y en la generación de una respuesta inmune de tipo humano adulto. Por lo tanto, además del uso evidente de las cepas en la generación de anticuerpos humanos, las cepas proporcionan una herramienta valiosa para el estudio de la naturaleza de los anticuerpos humanos en la respuesta inmune normal, así como en la respuesta anormal característica de enfermedades autoinmunes y otros trastornos.

Región variable – Diversidad cuantitativa

Se prevé que la especificidad de los anticuerpos (es decir, la capacidad para generar anticuerpos contra un amplio abanico de antígenos y, de hecho, contra un amplio abanico de epítomos independientes en los mismos) es dependiente de los genes de la región variable del genoma de la cadena pesada (V_H) y de la cadena ligera kappa (V_K). El genoma de la cadena pesada humana incluye aproximadamente 95 genes funcionales que codifican regiones variables de la cadena pesada humana de moléculas de inmunoglobulina. Además, el genoma de la cadena ligera humana incluye aproximadamente 40 genes en su extremo proximal que codifican regiones variables de la cadena ligera kappa humana de moléculas de inmunoglobulina. Se ha demostrado que la especificidad de los anticuerpos puede mejorarse a través de la inclusión de múltiples genes que codifican cadenas variables pesada y ligera.

En la presente invención se describen ratones transgénicos que tienen una parte sustancial del locus de Ig humana que incluye, preferiblemente, tanto un locus de la cadena pesada humana como un locus de la cadena ligera kappa humana. En realizaciones preferidas, por lo tanto, se utilizan más del 10% de los genes V_H y V_K humanos. Más preferiblemente, se utilizan más de aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60% o incluso el 70% de los genes V_H y V_K . En una realización preferida, se utilizan construcciones que incluyen 32 genes de la región proximal del genoma de la cadena ligera V_K y se utilizan 66 genes de la porción V_H del genoma. Como se apreciará, los genes pueden incluirse de forma secuencial, es decir, en el orden en el que se encuentran en el genoma humano, o fuera de secuencia, es decir, en un orden distinto del que se encuentran en el genoma humano, o en una combinación de los mismos. Por lo tanto, a modo de ejemplo, puede utilizarse una parte completamente secuencial del genoma de V_H o de V_K , o se pueden saltar diversos genes V en el genoma V_H o de V_K mientras se mantiene una organización secuencial de conjunto, o los genes V pueden reorganizarse dentro del genoma de V_H o de V_K y similares. En una realización preferida, el locus completo insertado se proporciona sustancialmente en una configuración de línea germinal, como se encuentra en seres humanos. En cualquier caso, se espera, y los resultados que se escriben en este documento demuestran, que la inclusión de un orden variado de genes del genoma de V_H y de V_K conduce a una mayor especificidad de anticuerpos y, en última instancia, a mayores afinidades de anticuerpos.

Además, preferiblemente, dichos ratones incluyen la región D_H completa, la región J_H completa, la región constante mu humana y, además, pueden estar provistos de otras regiones constantes humanas para la codificación y la generación de isotipos adicionales de anticuerpos. Dichos isotipos pueden incluir genes que codifican γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , α , ε y δ y otros genes que codifican la región constante con secuencias reguladoras y de cambio de clase apropiadas. Como se apreciará, y como se analiza con más detalle a continuación, pueden utilizarse de forma apropiada una diversidad de secuencias reguladoras y de cambio de clase junto con cualquier selección de región constante en particular.

La siguiente Tabla indica la diversidad de combinaciones de anticuerpos que son posibles en seres humanos, basándose estrictamente en la unión aleatoria de V-D-J y en la combinación con cadenas ligeras kappa, sin tener en consideración acontecimientos de adición de N o de mutación somática. En base a estas consideraciones, hay más de 3,8 millones de combinaciones de anticuerpos posibles en seres humanos, de cualquier isotipo en particular.

TABLA I

Región	Cadena pesada	Cadena ligera Kappa
Variable "V"	-95	40
De diversidad "D"	≥ 32	--
De unión "J"	6	5
Combinaciones (VxDxJ)	18,240	200
Combinaciones totales (Combinaciones HC x Combinaciones LC)	3,65x10 ⁶	

A través de la inclusión de aproximadamente 66 genes V_H y 32 genes V_K en un ratón con una dotación completa de genes D_H, J_H y J_K, la posible diversidad de la producción de anticuerpos es del orden de $2,03 \times 10^6$ anticuerpos diferentes. Como se ha indicado anteriormente, dicho cálculo no tiene en cuenta los acontecimientos de adiciones de nucleótidos N-terminales o de mutación somática. Por lo tanto, se apreciará que los ratones descritos en la presente invención, tales como las cepas de L6 y de XenoMouse II, ofrecen una diversidad de anticuerpos considerable. Preferentemente, se diseñan ratones que puedan producir más de 1×10^6 combinaciones V-D-J de la cadena pesada y combinaciones V-J de la cadena ligera kappa diferentes, sin tener en cuenta los acontecimientos de adiciones de nucleótidos N-terminales o de mutación somática.

Región variable – Diversidad cualitativa

Además de la diversidad cuantitativa, la selección cuantitativa de genes V (es decir, de un gran y variado número de genes V) y/o la selección cualitativa de genes V (es decir, selección de genes V en particular) parece desempeñar un papel en lo que se denomina en este documento como "diversidad cualitativa". La diversidad cualitativa, como se usa en este documento, se refiere a la diversidad de reorganizaciones V-D-J en las que se introducen acontecimientos de mutación somática y/o de diversidad de la unión. Durante la reorganización de la cadena pesada, ciertas enzimas (RAG-1, RAG-2 y posiblemente otras) son responsables de cortar el ADN que representa las regiones codificantes de los genes de anticuerpos. La actividad de la desoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt) está regulada positivamente, siendo responsable de las adiciones de nucleótidos N-terminales entre los segmentos génicos V-D y D-J. Enzimas similares y otras (SCID y otras enzimas de reparación del ADN) son responsables de la delección que se produce en las uniones de estos segmentos codificantes. Con respecto a la diversidad de la unión, tanto los acontecimientos de adición de N-nucleótidos como la formación de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) se incluyen dentro de esta expresión. Como se apreciará, la CDR3 está localizada sobre la región D e incluye los acontecimientos de las uniones V-D y D-J. Por lo tanto, las adiciones y delecciones de N-nucleótidos, durante tanto la reorganización de D-J como la reorganización de V-D, son responsables de la diversidad de CDR3.

Se ha demostrado que existen ciertas diferencias entre las diversidades de la unión murinas y humanas. En particular, algunos investigadores han publicado que las longitudes de adición de N-nucleótidos y las longitudes de CDR3 murinas son generalmente más cortas que las longitudes de adición de N-nucleótidos y las longitudes de CDR3 humanas típicas. Dichos grupos han publicado que, en seres humanos, se observan típicamente adiciones de N-nucleótidos de aproximadamente 7,7 bases de longitud de media. Yamada et al. (1991). Las adiciones de N-nucleótidos de tipo ratón son más frecuentemente del orden de aproximadamente 3 bases de longitud de media. Feeney et al. (1990). De forma similar, las longitudes de CDR3 de tipo humano son mayores que las de CDR3 de tipo ratón. En el hombre, son comunes longitudes de CDR3 de entre 2 y 25 restos, con una media de 14 restos. En ratones, algunos grupos han publicado longitudes medias de CDR3 más cortas.

La diversidad de la unión generada por adiciones de N-nucleótidos y adiciones de CDR3 desempeña un claro papel en el desarrollo de la especificidad de anticuerpos.

Se describen secuencias génicas V-D-J reorganizadas que muestran longitudes de adición de N-nucleótidos que son comparables a las longitudes de adición de N-nucleótidos esperadas en seres humanos adultos. Además, las secuencias de aminoácidos sobre la fase de lectura abierta (ORF) que se corresponde con las secuencias CDR3 muestran longitudes de CDR3 que son comparables a las longitudes de CDR3 esperadas en seres humanos adultos. Dichos datos son indicativos de que la diversidad cuantitativa de la región variable y/o la diversidad cualitativa de la región variable dan como resultado una diversidad de la unión de tipo humano. Se espera que dicha diversidad de la unión conduzca a una especificidad de anticuerpos de tipo más humano.

Región variable – Afinidades

Aunque no se ha demostrado de forma concluyente una relación causal directa entre la mayor inclusión de regiones variables y la especificidad de anticuerpos, parece y se espera que, a través del suministro de dicha diversidad, sea posible y se mejore la capacidad del ratón para producir una respuesta inmune contra una amplia colección de

antígenos. Además, dichos ratones parecen estar más preparados para producir respuestas inmunes contra una amplia colección de epítomos sobre antígenos o inmunógenos individuales. A partir de los presentes datos, también parece que los anticuerpos producidos de acuerdo con la presente invención poseen afinidades mejoradas. Dichos datos incluyen comparaciones entre ratones de acuerdo con la invención y cepas de XenoMouse I, así como la consideración de los resultados publicados por GenPharm International y por el MRC. Con respecto a las cepas de XenoMouse I, como se ha mencionado anteriormente, dichos ratones poseen una producción ineficaz de células B y una respuesta limitada contra diferentes antígenos. Dicho resultado parecía estar relacionado, en parte, con el limitado repertorio de genes V. De forma similar, los resultados publicados por GenPharm International y por el MRC indican una respuesta limitada contra diversos antígenos.

Sin desear quedar ligada a una teoría o modo de funcionamiento en particular de la invención, se entenderá que las afinidades mejoradas parecen ser el resultado del suministro de un gran número de regiones V. A partir de los presentes datos, el suministro de un gran número de y/o la selección de calidades de secuencias de genes V, potencia la diversidad de la unión (adiciones de N-nucleótidos y formación de diversidad de la región determinante de complementariedad 3 ("CDR3")), que es típica de una respuesta inmune de tipo humano adulto y que desempeña un papel importante en la maduración de afinidad de los anticuerpos. También puede ser que dichos anticuerpos sean más eficaces y eficientes en acontecimientos de mutación somática que conducen a afinidades mejoradas. Cada uno de los acontecimientos de diversidad de la unión y de mutación somática se analizan con más detalle a continuación.

Con respecto a las afinidades, los índices y las constantes de afinidad de anticuerpos que se obtienen mediante la utilización de múltiples genes V_H y V_K (es decir, el uso de 32 genes de la región proximal del genoma de la cadena ligera V_K y 66 genes de la porción V_H del genoma) dan como resultado índices de asociación (k_a en $M^{-1}S^{-1}$) de más de aproximadamente $0,50 \times 10^{-6}$, preferiblemente de más de $2,00 \times 10^{-6}$ y, más preferiblemente, de más de aproximadamente $4,00 \times 10^{-6}$; índices de disociación (k_d en S^{-1}) de menos de aproximadamente $1,00 \times 10^{-4}$, preferiblemente de menos de $2,00 \times 10^{-4}$ y, más preferiblemente, de menos de aproximadamente $4,00 \times 10^{-4}$; y constantes de disociación (en M) de menos de aproximadamente $1,00 \times 10^{-10}$, preferiblemente de menos de $2,00 \times 10^{-10}$ y, más preferiblemente, de menos de aproximadamente $4,00 \times 10^{-10}$.

Preferiblemente, dichos ratones además no producen inmunoglobulinas endógenas funcionales. Esto se consigue, por ejemplo, a través de la inactivación (o *knocking out*) de loci endógenos de las cadenas pesada y ligera. Por ejemplo, se inactivan la región J de la cadena pesada de ratón y la región J y la región C_k de la cadena ligera kappa de ratón a través de la utilización de vectores de recombinación homóloga que reemplazan o delecionan la región.

Región variable – Desarrollo de células B

El desarrollo de células B se revisa en Klaus B *Lymphocytes* (IRL Press (1990)) y en los Capítulos 1-3 de *Immunoglobulin Genes* (Academic Press Ltd. (1989)). Generalmente, en mamíferos, el desarrollo de células sanguíneas, incluyendo linfocitos de células B y T, tiene su origen en una célula madre pluripotente común. Después, los linfocitos evolucionan a partir de una célula progenitora linfóide común. Después de un periodo gestacional temprano, la generación de células B cambia del hígado a la médula ósea, donde permanece durante toda la vida del mamífero.

En el ciclo vital de una célula B, generalmente la primera célula reconocible es una célula pro-pre-B que se encuentra en la médula ósea. Dicha célula ha comenzado con la reorganización V-D-J de la cadena pesada, pero todavía no produce proteínas. Después, la célula evoluciona a una gran célula pre-B I que se divide rápidamente y que es una célula μ citoplasmática. Después, esta célula pre-B I deja de dividirse, se encoje y experimenta una reorganización V-J de la cadena ligera, convirtiéndose en una célula pre-B II que expresa IgM en la superficie y que abandona la médula como células B inmaduras. La mayoría de las células B inmaduras emergentes continúan desarrollándose y produciendo IgD en la superficie, indicativa de su finalización de la diferenciación y del desarrollo como células B periféricas inmunocompetentes completamente maduras, que residen principalmente en el bazo. Sin embargo, es posible eliminar la región constante delta y aun así obtener células inmunocompetentes.

La diferenciación y el desarrollo de células B pueden controlarse y/o rastrearse mediante el uso de marcadores de superficie. Por ejemplo, el antígeno B220 se expresa con relativa abundancia en células B maduras en comparación con células pre-B I o II. Por lo tanto, para determinar la presencia de células B maduras, pueden utilizarse células que son B220⁺ e IgM⁺ de superficie (μ). Además, las células pueden explorarse para determinar la expresión de IgD de superficie (δ^+). Otro antígeno, un antígeno termoestable, se expresa en células pre-B II en su transición hacia la periferia (es decir, a medida que se vuelven μ^- y/o μ^+ , δ^-).

TABLA II

Marcador	Médula ósea			Bazo	
	célula pro-pre-B	célula pre-B I	célula pre-B II célula B emergente	célula B inmadura	célula B madura
B220	-	-	±	+	++
HSA	-	-	+	±	-
μ	-	-	+	+	+
δ*	-	-	-	-	+

* Asumiendo la presencia de una copia funcional del gen Cδ en el transgén.

Usando marcadores de células B, tales como los mencionados anteriormente, puede controlarse y evaluarse el desarrollo y la diferenciación de células B.

Se ha demostrado anteriormente que los ratones DI (ratones que no experimentan la reorganización V-D-J de la cadena pesada ni la reorganización V-J de la cadena ligera) no producen células B maduras. De hecho, dichos ratones detienen la producción de células pro-pre-B y las células B nunca se movilizan desde la médula ósea hasta los tejidos periféricos, incluyendo el bazo. Por lo tanto, se detiene completamente tanto el desarrollo de células B como la producción de anticuerpos. Se observa el mismo resultado en ratones que sólo tienen inactivada la cadena pesada; el desarrollo y la diferenciación de células B se detiene en la médula ósea.

La presente cepa de XenoMouse I producía células B funcionales algo maduras. Sin embargo, el número de células B, tanto en la médula ósea como en los tejidos periféricos, se redujo significativamente con respecto a los ratones de tipo silvestre.

Por el contrario, las cepas de XenoMouse II y las cepas de L6 de la presente invención, poseían inesperadamente una reconstitución de células B casi completa. Por lo tanto, se ha demostrado que a través de la inclusión cuantitativa o cualitativa de genes de la región variable puede reconstituirse enormemente la diferenciación y el desarrollo de células B. La reconstitución de la diferenciación y del desarrollo de células B es indicativa de la reconstitución del sistema inmune. En general, la reconstitución de células B se compara con controles de tipo silvestre. Por lo tanto, preferentemente, poblaciones de ratones que tienen regiones variables humanas insertadas poseen más de aproximadamente el 50% de la función de células B en comparación con poblaciones de ratones de tipo silvestre.

Además, es interesante señalar que la producción de anticuerpos humanos mejor que anticuerpos de ratón está sustancialmente aumentada en ratones que tienen un fondo *knock out* de Ig endógena. Es decir, que los ratones que contienen un locus de Ig humana y un locus endógeno de Ig de la cadena pesada funcionalmente inactivado producen anticuerpos humanos en una cantidad de aproximadamente 100 a 1000 veces tan eficazmente como los ratones que sólo contienen un locus Ig humana y que no tienen inactivado el locus endógeno.

Cambio de isotipo

Como se analiza en detalle en este documento, y como se esperaba, los ratones XenoMouse II experimentan un cambio de isotipo eficaz y eficiente desde el isotipo μ codificado por el transgén humano hasta el isotipo gamma 2 codificado por el transgén. También se han desarrollado cepas de XenoMouse II que contienen y codifican la región constante gamma 4 humana. Como se ha mencionado anteriormente, los ratones descritos en la presente invención pueden estar provistos también de otras regiones constantes humanas para la generación de isotipos adicionales. Dichos isotipos pueden incluir genes que codifican γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , α , ϵ , δ y otros genes que codifican la región constante μ humana o, como alternativa, dichas otras regiones constantes pueden incluirse en otro cromosoma. Se apreciará que, cuando se incluyen dichas otras regiones constantes en el mismo cromosoma, como el cromosoma que incluye el transgén que codifica la región constante μ humana, puede efectuarse el cambio cis al otro isotipo o isotipos. Por otro lado, cuando dicha otra región constante se incluye en un cromosoma diferente del cromosoma que contiene el transgén que codifica la región constante μ , puede efectuarse el cambio trans al otro isotipo o isotipos. Dichas reorganizaciones permiten una gran flexibilidad en el diseño y la construcción de ratones para la generación de anticuerpos contra una amplia colección de antígenos.

Se apreciará que las regiones constantes tienen secuencias reguladoras y de cambio de clase conocidas con las que están asociadas. En 1989 ya se habían secuenciado y publicado todos los genes de la región constante murina y humana. Véase Honjo et al. "Constant Region Genes of the Immunoglobulin Heavy Chain and the Molecular Mechanism of Class Switching" en *Immunoglobulin Genes* (Honjo et al. eds., Academic Press (1989)). Por ejemplo, en la solicitud de patente de EEUU de nº de serie 07/574.748, se predijo la clonación de la región constante gamma 1 humana en base a la información de secuencia conocida de la técnica anterior. Se describió que, en el gen no reorganizado y no cambiado, la región de cambio de clase completa se incluía en una secuencia que comenzaba a menos de 5 kb del extremo 5' del primer exón constante γ -1. Por lo tanto, la región de cambio de clase también estaba incluida en el fragmento HindIII 5' de 5,3 kb que se describió en Ellison et al., *Nucleic Acids Res.* 10: 4071-

4079 (1982). De forma similar, Takahashi et al. *Cell* 29: 671-679 (1982) también publicaron que el fragmento descrito por Ellison contenía la secuencia de cambio de clase y que este fragmento, junto con el fragmento de HindIII a BamHI de 7,7 kb, debe incluir todas las secuencias necesarias para la construcción del transgén de cambio de isotipo de la cadena pesada.

5 Por lo tanto, se apreciará que cualquier región constante humana de elección puede incorporarse fácilmente, sin excesiva experimentación, en los ratones descritos en la invención. Dichas regiones constantes pueden asociarse con sus secuencias de cambio de clase nativas (es decir, una región constante $\gamma_{1, 2, 3 \text{ o } 4}$ humana con una de cambio de clase $\gamma_{1, 2, 3 \text{ o } 4}$ humana, respectivamente) o pueden asociarse con otras secuencias de cambio de clase (es decir, una región constante γ_4 humana con una de cambio de clase γ_2 humana). También pueden utilizarse diversas secuencias potenciadoras 3', tales como de ratón, ser humano o rata, por nombrar algunas. De forma similar, también pueden incluirse otras secuencias reguladoras.

15 Como alternativa a, y/o además del cambio de isotipo *in vivo*, las células B pueden seleccionarse por la secreción de anticuerpos "quiméricos". Por ejemplo, los ratones L6, además de producir anticuerpos IgM completamente humanos, producen anticuerpos que tienen regiones V, D y J de la cadena pesada completamente humanas acopladas con regiones constantes de ratón, tales como una diversidad de gammas (es decir, IgG1, 2, 3 y 4 de ratón) y similares. Dichos anticuerpos son muy útiles por méritos propios. Por ejemplo, en los anticuerpos pueden incluirse regiones constantes humanas mediante técnicas de cambio de isotipo *in vitro* bien conocidas en la materia.

20 Como alternativa, y/o además, pueden prepararse fragmentos (es decir, fragmentos F(ab) y F(ab')₂) de dichos anticuerpos que contienen escasas o ninguna región constante de ratón.

25 Como se ha analizado anteriormente, el factor más crítico en la producción de anticuerpos es la especificidad contra un antígeno o un epítipo sobre un antígeno deseado. Por lo tanto, la clase del anticuerpo se hace importante de acuerdo con la necesidad terapéutica. En otras palabras, ¿se mejorará el índice terapéutico de un anticuerpo proporcionando una clase o isotipo en particular? La consideración de esta pregunta plantea cuestiones de fijación del complemento y similares, que después dirigen la selección de la clase o isotipo en particular de anticuerpo. Las regiones constantes gamma ayudan en la maduración de la afinidad de los anticuerpos. Sin embargo, para conseguir dicha maduración no se requiere la inclusión de una región constante gamma humana en un transgén.

30 Más bien, el proceso también parece transcurrir en relación con regiones constantes gamma de ratón que cambian a forma trans sobre el transgén codificado mu.

Materiales y métodos

35 Los siguientes Materiales y Métodos se utilizaron en relación con la generación y la caracterización de ratones descritos en la presente invención. Se pretende que dichos Materiales y Métodos sean ilustrativos.

Clonación de YAC derivados de Ig humanas: Se exploraron las genotecas de YAC humanos de la Universidad de Washington (Brownstein et al., 1989) y del CEPH (Abertsen et al., 1990) para encontrar YAC que contienen secuencias de los loci de las cadenas pesada y ligera kappa humanas, como se ha descrito anteriormente (Méndez et al., 1995). Méndez et al., (1995) describieron la clonación y la caracterización de los YAC 1H y 1K. Los YAC 3H y 4H se identificaron a partir de la genoteca de la Universidad de Washington usando una sonda V_H3 (PstI/NcoI de 0,55 kb, Berman et al., 1988). El YAC 17H se clonó a partir de la genoteca de YAC GM 1416 y se determinó que contenía 130 kb de secuencias variables de la cadena pesada y una región quimérica de 150 kb en su extremo 3', Matsuda et al., 1993. Los YAC 2K y 3K se recuperaron de la genoteca del CEPH usando un cebador específico de V_KII (Albertsen et al., 1990).

Direccionamiento y recombinación de YAC: Para el cultivo, la reproducción, la esporulación y el ensayo del fenotipo de levaduras se emplearon métodos convencionales (Sherman et al., 1986). El direccionamiento de los YAC y de los brazos de vectores YAC con marcadores de selección de levaduras y de mamíferos, para facilitar la selección de YAC recombinantes en levaduras de integración de YAC en células, se consiguió por transformación con acetato de litio (Scheistl y Geitz (1989)). Después de cada etapa de direccionamiento o de recombinación, el YAC (o los YAC) modificado se analizó por electroforesis en gel de campo pulsado y transferencias de Southern convencionales para determinar la integridad de todas las secuencias.

55 Se usaron vectores de direccionamiento de YAC para la interconversión de los brazos céntricos y acéntricos para reorientar al 17H y modificar su brazo 5' con los genes LEU2 y URA3 y su brazo 3' con el gen HIS3. Véase la Fig. 1a y Méndez et al., 1993. El brazo céntrico 4H se modificó con los marcadores de selección del gen ADE2 de levaduras y del HPRT humano. Para la primera etapa de recombinación, se generó y se seleccionó una cepa de levadura diploide en la que estaban presentes, intactos y mantenidos de forma estable, los tres YAC 17H, 3H y 4H. Se indujo una recombinación homóloga de tres vías entre las regiones de YAC solapantes por esporulación y el recombinante deseado se encontró mediante la selección de los marcadores de selección de levaduras externos (ADE2 e HIS3) y la selección negativa (pérdida) del marcador interno URA3. La recombinación con éxito generó un YAC de 880 kb que contenía el 80% de la región variable de IgH, que comenzaba en V_H2-5 y se prolongaba 20 kb hasta el extremo 5' del gen V_H3-65. Para la recombinación del YAC de 880 kb con 1H, se modificó el 1H con la incorporación de pICL, que añade el gen LYS2 en el brazo céntrico (Hermanson et al., 1991). Usando una reproducción de levaduras

convencional, se seleccionó una cepa diploide que contenía tanto el YAC 1H como el de 880 kb. Tras la esporulación, y mediante el uso de la homología de solapamiento, se llevó a cabo la recombinación YAC-levadura. Con selección positiva para los marcadores de levaduras externos (ADE2 y URA3) y exploración para determinar la pérdida de los marcadores internos (TRP1, LYS2 e HIS3) se encontró un YAC intacto de 970 kb constituido por aproximadamente 66 segmentos V_H , que comenzaban en V_{H6-1} y terminaban en V_{H3-65} . El YAC también contenía los principales grupos de genes D, genes J_H , el potenciador intrónico (E_μ), C_μ , hasta 25 kb por delante de $C\delta$ en configuración de línea germinal. Este YAC de 970 kb se modificó después con la incorporación de un vector de dirección que incluía un fragmento genómico EcoRI de 23 kb del gen γ -2 humano, incluyendo sus elementos de reguladores y de cambio de clase, un fragmento XbaI de 7 kb del potenciador 3' de la cadena pesada murina, el gen de la neomicina dirigido por el promotor de la metalotionina (MMTNeo) y el gen LYS2 de levaduras. Este vector, aunque introduce estas secuencias en el brazo 3' del YAC, interrumpe el gen URA3.

Como primera etapa para la generación del YAC yK2, se seleccionó, mediante reproducción de levaduras convencional, una cepa de levadura diploide en la que estaban presentes, intactos y mantenidos de forma estable, los YAC tanto 1K como 3K modificados. Usando el mismo proceso que se ha descrito con respecto a la construcción IgH, se llevó a cabo la recombinación YAC-levadura. Mediante el uso de selección positiva para los marcadores de levaduras externos (LYS2 y TRP1) y la exploración para determinar la pérdida de marcadores internos (URA3 y TRP1), se encontró un producto recombinante intacto de 800 kb que contenía 32 V_K , que comenzaban en V_{K-B3} y terminaban en V_{K-Op11} . El YAC de 800 kb contiene una delección de aproximadamente 100 kb que comienza en $V_{K-Lp-13}$ y termina en V_{K-Lp-5} . Sin embargo, el YAC está en una configuración de línea germinal desde $V_{K-Lp-13}$ hasta 100 kb por delante de V_{K-Op-1} . El YAC también contiene J_K , los potenciadores intrónicos y 3', la C_K constante y Kde.

Introducción de YAC en células ES y en ratones: Se fusionaron esferoplastos de levaduras que contenían YAC con células ES E14.TG3B1 como se ha descrito (Jakobovits et al., 1993a; Green et al., 1994). Se aumentó el número de colonias resistentes a HAT para su análisis. Se evaluó la integridad del YAC mediante el análisis de transferencia de Southern usando los protocolos y las sondas que se describen en Berman et al., (1988) y Méndez et al., (1994) y las condiciones de hibridación que se describen en Gemmil et al., (1991). Se generaron ratones quiméricos por microinyección de células ES en blastocistos de C57BL/6. Se identificaron los descendientes que contenían YAC por análisis PCR de ADN de cola, como se ha descrito (Green et al., 1994). Se evaluó la integridad del YAC mediante el análisis de transferencia de Southern usando las sondas y las condiciones descritas anteriormente, excepto por que la transferencia sondada con V_{H3} humana se lavó a 50°C.

Análisis de citometría de flujo: Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica y de bazo de ratones XenoMice y de control de 8-10 semanas de edad, se purificaron en Lympholyte M (Accurate) y se trataron con anti-receptor Fc CD32/CD16 de ratón purificado (Pharmingen, 01241D) para bloquear la unión inespecífica a receptores Fc, se tiñeron con anticuerpos y se analizaron en un FACStar^{PLUS} (Becton Dickinson, CELLQuest software). Anticuerpos usados: anti-B220 con alofococianina (APC) (Pharmingen, 01129A); anti-IgM humana con biotina (Pharmingen, 08072D), anti-IgM de ratón con biotina (Pharmingen, 02202D), F(ab')₂ de cabra anti-IgD humana con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Southern Biotechnology, 2032-02); anti-IgD^a de ratón con FITC (Pharmingen, 05064D); anti-mIgD^b con FITC (Pharmingen, 05074D); anti- λ de ratón con FITC (Pharmingen, 02174D); anti- κ humana con PE (Pharmingen, 08175A); anti- κ de ratón con PE (Pharmingen, 02155A). Se usó RED613TM-estreptavidina (GibcoBRL, 19541-010) para detectar anticuerpos biotinilados.

Inmunización y generación de hibridomas: Se inmunizaron XenoMice (de 8 a 10 semanas de edad) por vía intraperitoneal con 25 μ g de IL-8 humana recombinante o con 5 μ g de TNF- α (Biosource International) emulsionados en adyuvante completo de Freund para la inmunización primaria y en adyuvante incompleto de Freund para las inmunizaciones adicionales que se realizaron a intervalos de dos semanas. Para la inmunización con EGFR, se inmunizaron XenoMice por vía intraperitoneal con 2 x 10⁷ células A431 (ATCC CRL-7907) resuspendidas en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Esta dosis se repitió tres veces. Cuatro días antes de la fusión, los ratones recibieron una inyección final de antígeno o de células en PBS. Los linfocitos de bazo y de ganglios linfáticos de ratones inmunizados se fusionaron con la línea de mieloma no secretor NSO-bcl2 (Ray y Diamond, 1994) y se sometieron a selección con HAT, como se ha descrito anteriormente (Galfre y Milstein, 1981).

Ensayo de ELISA: El ELISA para la determinación de anticuerpos específicos de antígeno en suero de ratón y en sobrenadantes de hibridoma se realizó como se ha descrito (Coligan et al., 1994) usando IL-8 y TNF- α humanos recombinantes y EGFR purificado por afinidad a partir de células A431 (Sigma, E-3641) para capturar los anticuerpos. La concentración de inmunoglobulinas humanas y de ratón se determinó usando los siguientes anticuerpos de captura: anti-IgG humana de conejo (Southern Biotechnology, 6145-01), anti-Ig κ humana de cabra (Vector Laboratories, AI-3060) y anti-IgM humana de ratón (CGI/ATCC, HB-57) para Ig γ , κ y μ humanas respectivamente y anti-IgG de ratón de cabra (Caltag, M 30100), anti-Ig κ de ratón de cabra (Southern Biotechnology, 1050-01), anti-IgM de ratón de cabra (Southern Biotechnology, 1020-01) y anti- λ de ratón de cabra (Southern Biotechnology, 1060-01) para capturar las Ig γ , κ , μ y λ de ratón, respectivamente. Los anticuerpos de detección que se usaron en los experimentos de ELISA eran anti-IgG de ratón de cabra con HRP (Caltag, M30107), anti-Ig κ de ratón de cabra con HRP (Caltag, M 33007), anti-IgG2 humana de ratón con HRP (Southern Biotechnology, 9070-05), anti-IgM humana de ratón con HRP (Southern Biotechnology, 9020-05) y anti-kappa humana de cabra con biotina

(Vector, BA-3060). Los patrones que se usaron para la cuantificación de Ig humana y de ratón fueron: IgG₂ humana (Calbiochem, 400122), IgM κ humana (Cappel, 13000), IgG₂ κ humana (Calbiochem, 400122), IgG κ de ratón (Cappel 55939), IgM κ de ratón (Sigma, M-3795) e IgG₃ λ de ratón (Sigma, M-9019).

5 **Determinación por BIAcore de las constantes de afinidad de Mab completamente humanos:** La medición de la afinidad de anticuerpos monoclonales humanos purificados, fragmentos Fab o sobrenadantes de hibridomas mediante resonancia de plasmón superficial se llevó a cabo usando el instrumento BIAcore2000, usando los procedimientos generales indicados por los fabricantes.

10 El análisis cinético de los anticuerpos se realizó usando antígenos inmovilizados sobre la superficie detectora a una baja densidad: IL-8 humana-81 RU, EGFR soluble purificado a partir de membranas de células A431 (Sigma, E-3641)-303 RU y TNF- α -107 RU (1.000 RU se corresponden con aproximadamente 1 ng/mm² de proteína inmovilizada). Los índices de disociación (kd) y de asociación (ka) se determinaron usando el programa informático proporcionado por los fabricantes, BIAevaluation 2.1.

15 **Mediciones de afinidad por radioinmunoensayo:** Se incubó IL-8 humana marcada con ¹²⁵I (1,5 x 10⁻¹¹ M o 3 x 10⁻¹¹ M) con anticuerpos anti-IL-8 humana purificados a concentraciones variables (5 x 10⁻¹³ M a 4 x 10⁻⁹ M) en 200 μ l de PBS con BSA al 0,5%. Después de 15 h de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 20 μ l de Proteína A Sepharose CL-4B en PBS (1/1, v/v) para precipitar el complejo anticuerpo-antígeno. Después de 2 h de incubación a 20 4°C, el complejo anticuerpo-I¹²⁵-IL-8 unido a Proteína A-Sepharose se separó de la I¹²⁵-IL-8 por filtración usando placas de filtración de 96 pocillos (Millipore, N° Cat. MADVN65), se recogieron en viales de centelleo y se contaron. Se calculó la concentración de anticuerpos libres y unidos y se obtuvo la afinidad de unión de los anticuerpos al antígeno específico usando un análisis Scatchard (2).

25 **Ensayos de unión a receptor:** El ensayo de unión al receptor de IL-8 se llevó a cabo con neutrófilos humanos preparados a partir de sangre recién extraída o a partir de capas leucoplaquetarias, como se ha descrito (Lusti-Marasimhan et al., 1995). Se incubaron concentraciones variables de anticuerpos con [¹²⁵I]-IL-8 0,23 nM (Amersham, IM-249) durante 30 min a 4°C en placas con filtro Multiscreen de 96 pocillos (Millipore, MADV N6550) pretratadas con tampón PBS de unión que contenía albúmina de suero bovino al 0,1% y NaN₃ al 0,02% a 25°C 30 durante 2 horas. Se añadieron 4 x 10⁵ neutrófilos a cada pocillo y las placas se incubaron durante 90 min a 4°C. Las células se lavaron 5 veces con 200 μ l de PBS helado que se retiró por aspiración. Los filtros se secaron al aire, se añadieron a líquido de centelleo y se contaron en un contador de centelleo. El porcentaje de [¹²⁵I]-IL-8 unida específicamente se calculó como la cpm media detectada en presencia de anticuerpo dividida por la cpm detectada en presencia sólo de tampón.

35 Los ensayos de unión para el receptor TNF se realizaron de una forma similar a la de los ensayos de IL-8 descritos anteriormente. Sin embargo, se utilizó la línea de monocitos humanos U937 en lugar de la línea de neutrófilos usada en relación con los ensayos de IL-8. Los anticuerpos se preincubaron con [¹²⁵I]-TNF 0,25 nM (Amersham, IM-206). Se colocaron 6 x 10⁵ células U937 en cada pocillo.

40 El ensayo de unión al receptor de EGF se llevó a cabo con células A431 (0,4 x 10⁶ células por pocillo) que se incubaron con concentraciones variables de anticuerpos en tampón PBS de unión durante 30 minutos a 4°C. Se añadió [¹²⁵I]-EGF 0,1 nM (Amersham, IM-196) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 90 min a 4°C. Las placas se lavaron cinco veces, se secaron al aire y se contaron en un contador de centelleo. Se usaron los anticuerpos de ratón anti-EGFR 225 y 528 (Calbiochem) como controles.

45 **Análisis del repertorio de transcritos de Ig humana expresados en XenoMice y sus Mab humanos derivados:** Se aisló ARNm poli(A)⁺ a partir de bazo y ganglios linfáticos de XenoMice inmunizados y no inmunizados usando un kit Fast-Track (Invitrogen). La generación de ADNc cebado aleatoriamente se siguió de PCR. Se usaron cebadores 50 de la región variable específicos de la familia V_H humana o V_K humana (Marks et al., 1991) o un cebador de V_H humana universal, MG-30 (CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCIGG), junto con cebadores específicos para las regiones constantes C μ (h μ P2) o C κ (h κ P2) humanas, como se han descrito anteriormente (Green et al., 1994), o para la región constante γ 2 humana MG-40d; 5'-GCTGAGGGAGTAGAGTCCTGAGGA-3'. Los productos de PCR se clonaron en pCRII usando un kit de clonación TA (Invitrogen) y se secuenciaron ambas cadenas usando kits de 55 secuenciación con colorante terminador Prism y una máquina de secuenciación ABI 377. Se obtuvieron las secuencias de los transcritos de las cadenas pesada y kappa procedentes de Mab humanos mediante la secuenciación directa de los productos de PCR generados a partir del ARN poli(A)⁺ usando los cebadores descritos anteriormente. Todas las secuencias se analizaron mediante alineamientos con el "V BASE sequence directory" (Tomlinson et al., MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) usando los programas informáticos 60 MacVector y Geneworks.

Preparación y purificación de fragmentos Fab de anticuerpos: Se produjeron fragmentos Fab de anticuerpos mediante el uso de papaína inmovilizada (Pierce). Los fragmentos Fab se purificaron con un programa cromatográfico de dos etapas: columna de Proteína A HiTrap (Bio-Rad) para capturar los fragmentos Fc y cualquier anticuerpo no digerido, seguida de la elución de los fragmentos Fab retenidos en el flujo continuo en una columna de

intercambio catiónico fuerte (PerSeptive Biosystems) con un gradiente salino lineal hasta NaCl 0,5 M. Los fragmentos Fab se caracterizaron por SDS-PAGE y MALDI-TOF MS en condiciones reductoras y no reductoras poniendo de manifiesto el fragmento no reducido de ~50 kD y el doblete reducido de ~25 kDa esperados. Este resultado pone de manifiesto la cadena ligera intacta y la cadena pesada escindida. La EM en condiciones reductoras permitió la identificación inequívoca tanto de la cadena ligera como de la pesada escindida puesto que la masa de la cadena ligera puede determinarse con exactitud mediante la reducción del anticuerpo completo no digerido.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados obtenidos, se proporcionan solo con fines ilustrativos.

Ejemplo 1: Reconstrucción de loci de la cadena pesada humana en YAC

La estrategia que se utilizó para reconstruir las regiones variables de la cadena pesada humana y de la cadena ligera kappa humana consistió en, primero, explorar genotecas de YAC humanos para encontrar los YAC que abarcaban los grandes loci de Ig humanas (del tamaño de megabases) y, en segundo lugar, recombinar los YAC que abarcaban dichas regiones en YAC individuales que contenían los loci deseados predominantemente en una configuración de línea germinal.

El anterior esquema de recombinación de YAC, paso a paso, aprovechaba la alta frecuencia de recombinación homóloga inducida por la meiosis en levaduras y la capacidad de seleccionar los recombinantes deseados mediante los marcadores de levaduras presentes en los brazos del vector de los YAC recombinados. (Véanse la Figura 1 y Green et al., anteriormente; véanse también Silverman et al., 1990 y denDunnen et al., 1992).

Con respecto a la presente estrategia, se identificaron cuatro YAC, 1H (240 kb), 2H (270 kb), 3H (300 kb) y 4H (340 kb), que abarcaban aproximadamente 830 kb de los aproximadamente 1000 kb de la región variable de la cadena pesada humana en el cromosoma 14q. Se usaron los YAC 1H, 2H, 3H y 4H para la reconstrucción del locus (Véase la Figura 1A). La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y el análisis de transferencia de Southern confirmaron que los YAC estaban intactos, en configuración de línea germinal, excepto por 150 kb en el extremo 3' del YAC 2H que contenían ciertas secuencias de no-IgH (Véanse la Figura 1; Matsuda et al., 1990). El YAC 1H, el YAC que se ha introducido anteriormente en la primera generación de XenoMouse™ (Green et al., anteriormente; Méndez et al., 1995) está constituido por las regiones C_δ, C_μ, J_H y D_H humanas y los primeros 5 genes V_H en configuración de línea germinal. Los otros tres YAC abarcan la mayoría de la región V_H, desde V_H2-5 hasta V_H3-65, contribuyendo, por lo tanto, con aproximadamente 61 genes V_H diferentes adicionales. Antes de la recombinación, el YAC 4H se modificó para incorporar un marcador de selección de HPRT. A través de la utilización de secuencias solapantes contenidas en los YAC, los cuatro YAC (1H, 2H, 3H y 4H) se recombinaron en levaduras mediante una estrategia de recombinación paso a paso (Véase la Figura 1). Dicha estrategia de recombinación generó un YAC recombinante de 980 kb (Véase la Figura 1). El análisis de los YAC mediante PFGE y análisis de transferencia de Southern confirmó la presencia del locus de la cadena pesada humana desde la región C_δ hasta 20 kb del extremo 5' del gen V_H3-65 en configuración de línea germinal. No se observaron deleciones ni reorganizaciones aparentes.

El brazo acéntrico del YAC se dirigió con un vector que llevaba la región constante γ2 humana completa, un potenciador 3' de ratón y el gen de resistencia a neomicina, para producir el YAC de la cadena pesada final de 1020 kb, yH2. El YAC yH2 contenía la mayor parte de la región variable humana, es decir, 66 de los 82 genes V_H, D_H completa (32 genes) y regiones J_H (6 genes) y tres regiones constantes diferentes (C_μ, C_δ y C_γ) con sus correspondientes secuencias reguladoras (Véase la Figura 1A). Ésta fue la construcción de la cadena pesada que se utilizó para la producción de las cepas de XenoMouse II.

Ejemplo 2: Reconstrucción de loci de la cadena ligera kappa humana en YAC

Para la reconstrucción del locus de la cadena ligera kappa humana se utilizó una estrategia de recombinación paso a paso similar. Se identificaron tres YAC que abarcaban los loci kappa humanos. Los YAC se denominaron 1K, 2K y 3K. El YAC 1K, que tenía una longitud de aproximadamente 180 kb, se había introducido anteriormente en la primera generación de XenoMouse™. Dicho YAC contenía el elemento de deleción kappa (Kde), los potenciadores intrónicos y 3' kappa, C_κ, J_κ y los tres genes V_κ del grupo B (Green et al., 1994; Méndez et al., 1995). Los YAC 2K (de aproximadamente 480 kb) y 3K (de aproximadamente 380 kb) juntos incluían la mayor parte de la región variable proximal de la cadena kappa en el cromosoma 2p. Una deleción de aproximadamente 100 kb abarca la región L13-L15 (Fig. 1B; Hurber et al., 1993). Puesto que la región distal kappa duplica a la región proximal, y como los genes V_κ proximales son los que se utilizan más comúnmente en humanos (Weichold et al., 1993; Cox et al., 1994), la presente estrategia de reconstrucción se centró en la región proximal (Fig. 1B). Mediante la recombinación homóloga de los tres YAC, se recuperó un YAC recombinante de 800 kb, yK2. El tamaño y la integridad del YAC recombinante se confirmaron mediante PFGE y análisis de transferencia de Southern. Dicho análisis demostró que abarcaba la parte proximal del locus de la cadena kappa humana, con 32 genes V_κ en configuración de línea

germinal, excepto por la delección descrita en la región Lp (Fig. 1B). Se modificaron los brazos céntricos y acéntricos de yK2 para que contuvieran los marcadores de selección de HPRT y de neomicina, respectivamente, como se describe en los (Materiales y métodos). Ésta fue la construcción de la cadena ligera kappa que se utilizó para la producción de las cepas de XenoMouse II.

Los YAC que se describen en este documento, yH2 e yK2, representan los primeros loci de Ig humanas reconstruidos del tamaño de megabases que contienen la mayor parte del repertorio de anticuerpos humanos, predominantemente en configuración de línea germinal. Esta realización confirmó además que la recombinación homóloga en levaduras es un enfoque poderoso para la reconstrucción con éxito de loci grandes, complejos e inestables. La selección de recombinantes de YAC estables que contenían grandes porciones de los loci de Ig en levaduras proporcionó los fragmentos de Ig humanas que se requerían para dotar a los ratones con el repertorio de anticuerpos humanos, regiones constantes y elementos reguladores necesarios para reproducir la respuesta de anticuerpos humanos en ratones.

Ejemplo 3: Introducción de YAC yH2 e yK2 en células ES

De acuerdo con la presente estrategia, se introdujeron los YAC yH2 e yK2 en células madre embrionarias (ES) de ratón. Una vez que se aislaron las células ES que contenían el ADN de YAC, dichas células ES se utilizaron para la generación de ratones a través de una reproducción apropiada.

Por lo tanto, en este experimento se introdujeron los YAC yH2 e yK2 en células ES mediante la fusión de esferoplastos de levadura que contenían los YAC con células ES de ratón E14.TG3B1 deficientes en HPRT, como se ha descrito anteriormente (Jakobovits et al., 1993a; Green et al., 1994). Se seleccionaron clones de células ES positivos a HPRT a una frecuencia de 1 clon/15-20 x 10⁶ células fusionadas y se analizaron para determinar la integridad de los YAC mediante análisis de transferencia de Southern y de CHEF (Fig. 2A).

Se descubrió que siete de los treinta y cinco clones de células ES (denominados L10, J9.2, L17, L18, J17, L22 y L23) procedentes de la fusión de células ES con levaduras que contenían yH2 contenían todos los fragmentos de yH2 EcoRI y BamHI esperados, detectados mediante sondas que abarcaban el inserto completo: potenciador 3' de ratón, potenciador intrónico humano, regiones constantes C₂, C_δ y C_μ humanas, D_H, J_H y todas las diferentes familias V_H: V_H1, V_H2, V_H3, V_H4, V_H5 y V_H6 (en la Fig. 2A se muestran los datos para 5 clones). El análisis de CHEF confirmó además que estos clones, que representan el 20% de todos los clones analizados, contienen el YAC yH2 intacto completo sin delecciones ni reorganizaciones aparentes (no se muestran los datos).

Los clones de células ES procedentes de la fusión de levaduras que contenían yK2 se analizaron de forma similar para determinar la integridad del YAC, usando sondas específicas para el Kde humano, los potenciadores intrónicos y 3' kappa, C_K, J_K y todas las diferentes familias de V_K: V_KI, V_KII, V_KIII, V_KIV y V_KVI. Veinte clones de los sesenta clones tenían el YAC intacto e inalterado, lo que representa el 30% del total de clones analizados (en la Fig. 3A se muestran los datos para dos clones ES). Se detectaron cantidades variables de secuencias genómicas de levadura en clones de células ES yH2 e yK2 (no se muestran los datos).

Estos resultados constituyen la primera demostración de la introducción de construcciones del tamaño de megabases que incluyen loci humanos reconstruidos, predominantemente en configuración de línea germinal, en células de mamíferos. La relativamente alta frecuencia de YAC intactos integrados en el genoma de ratón además da validez la metodología de fusión de esferoplastos de levaduras-células ES como un enfoque eficaz para la introducción fiel de grandes fragmentos genómicos humanos en células ES.

Ejemplo 4: Generación de cepas de XenoMouse II.

Para generar ratones a partir de las células ES que contienen ADN de YAC, se realizó la microinyección de blastocistos seguida de reproducción. Por lo tanto, se expandieron los clones de células ES que llevaban yH2 e yK2 y se microinyectaron en blastocistos de ratón C57BL/6J (Green et al., 1994) y los machos quiméricos producidos se evaluaron para determinar la transmisión de la línea germinal. Se identificó la descendencia con YAC transmitidos mediante el análisis por PCR y se confirmó la integridad de los YAC mediante análisis de transferencia de Southern. En todos los ratones transgénicos analizados se demostró que los YAC estaban en forma intacta (FIG. 2B, 3B). Los siete clones yH2-ES microinyectados y dos de los ocho clones yK2-ES se transmitieron a través de la línea germinal de ratón.

Para generar ratones que produjeran anticuerpos humanos frente a la exclusión de anticuerpos endógenos, se cruzaron ratones transgénicos yH2 o yK2 con cepas de ratón con una doble inactivación (DI). Las cepas de ratón DI son homocigotas para la inactivación genética dirigida de los loci de las cadenas pesada y kappa de ratón y, por lo tanto, son deficientes en la producción de anticuerpos (Jakobovits et al., 1993b; Green et al., 1994). Dos de las cepas de ratón transgénico yH2, L10 y J9.2, y una de las cepas de ratón transgénico yK2, J23.1, se cruzaron con ratones DI para generar ratones que llevasen YAC en un fondo homocigoto de cadenas pesada y kappa de ratón inactivadas (yH2;DI e yK2;DI). Cada una de las cepas transgénicas yH2;DI se cruzó con la cepa transgénica yK2;DI para generar dos cepas de XenoMouse II, 2A-1 (L10;J23.1;DI) y 2A-2 (J9.2;J23.1;DI), respectivamente, que

contenían los YAC tanto de la cadena pesada como de la ligera en fondo DI homocigoto. L10 es completamente homocigota y J9.2 y J23.1 están en proceso de llevarse a homocigosis con éxito.

La integridad de los YAC de las cadenas pesada y kappa humanas en las cepas de XenoMouse II se confirmó mediante análisis de transferencia de Southern. Como se muestra en la Fig. 2 y en la Fig. 3, en ambas cepas de XenoMouse analizadas, yH2 e yK2 se transmitieron inalterados a través de múltiples generaciones sin delecciones ni reorganizaciones aparentes.

Ejemplo 5: Desarrollo de células B y producción de anticuerpos humanos mediante ratones XenoMouse II

Para caracterizar adicionalmente las cepas de XenoMouse II, se estudió su desarrollo de células B y su producción de anticuerpos humanos. La reconstitución del desarrollo de células B y de la producción de anticuerpos en XenoMouse II mediante los YAC yH2 e yK2 se evaluó mediante citometría de flujo y ELISA. Al contrario que los ratones DI, que carecen completamente de células B maduras, los XenoMouse II manifestaron esencialmente un desarrollo de células B normal, ascendiendo la población de células B maduras en la sangre a un total de más del 50% del nivel observado en la raza de tipo silvestre (Fig. 4A). Se demostró que todas las células B expresaban IgM humana y altos niveles de B220 (IgM⁺ humana/B220^{hi}), expresando también el 60% de esta población IgD humana. Se obtuvieron resultados similares a partir del análisis de bazo y ganglios linfáticos de XenoMouse (no se muestran los datos). Estos resultados se correlacionan bien con las características de las células B maduras en ratones de tipo silvestre, indicando una maduración de células B apropiada en XenoMouse.

La mayoría de las células B de XenoMouse (75-80%) expresaban exclusivamente la cadena ligera kappa (κ) humana, mientras que sólo aproximadamente el 15% expresaban la cadena ligera lambda (λ) de ratón (Fig. 4). Esta relación de distribución de cadenas ligeras ($h\kappa/m\lambda$: 75:15) es comparable a la observada en ratones de tipo silvestre, indicando una regulación de tipo ratón de la utilización de las cadenas ligeras. Por el contrario, los XenoMouse I, como se describe en Green et al., 1994, demostraron una relación de $h\kappa/m\lambda$: 55:45 (no se muestran los datos). Se realizaron observaciones similares para células B de bazo (Fig. 4B) y ganglios linfáticos (no se muestran los datos), indicando que la mayoría de las células B de XenoMouse II producían exclusivamente anticuerpos completamente humanos. Los niveles de células B que expresaban $m\lambda$ se redujeron desde el 15% hasta el 7% en cepas de XenoMouse II homocigotas para yK2 (no se muestran los datos).

Ejemplo 6: Generación de la cepa L6

La cepa L6 de ratones se generó de forma idéntica al proceso descrito anteriormente con respecto a la generación de las cepas de XenoMouse II. Sin embargo, debido a un acontecimiento de delección durante la generación de la línea de células ES L6, la línea de células ES y, posteriormente, los ratones L6 evolucionaron sin una porción de la secuencia distal a C δ , eliminándose por lo tanto la región constante C γ y sus secuencias reguladoras. Después de la finalización de la reproducción, los ratones L6 contendrán la construcción yK2 completa y la construcción yH2 completa, excepto por la región constante C γ que falta.

Ejemplo 7: Producción de anticuerpos humanos

La expresión de las cadenas C μ , C γ 2 y ligera κ humanas se detectaron en sueros de XenoMouse II no inmunizados a niveles máximos de 700, 600 y 800 μ g/ml, respectivamente. Para determinar estos valores en comparación con los de los de tipo silvestre, se midieron los niveles máximos de las cadenas C μ , C γ 2 y ligera κ de ratón en ratones C57BL/6J x 129 mantenidos en condiciones similares libres de patógenos. Los valores para C μ , C γ y la cadena ligera κ en ratones de tipo silvestre fueron de 400, 2000 y 2000 μ g/ml, respectivamente. Después de la inmunización, los niveles de la cadena γ humana aumentaron hasta aproximadamente 2,5 mg/ml. La concentración de λ de ratón fue de sólo 70 μ g/ml, confirmando además el uso preferencial de la cadena kappa humana.

Estos descubrimientos confirmaron la capacidad de los YAC de Ig humanas introducidos para inducir una reorganización génica y un cambio de clase de Ig apropiados y para generar niveles significativos de anticuerpos IgM e IgG completamente humanos antes y después de la inmunización.

Ejemplo 8: Un repertorio variado de anticuerpos humanos en XenoMouse II

Para entender adicionalmente la reconstitución del repertorio de anticuerpos en cepas de XenoMouse II, se expusieron ratones a varios antígenos y se prepararon líneas celulares de hibridoma que secretaban dichos anticuerpos. Como se entenderá, la recapitulación de la respuesta de anticuerpos humanos en ratones requiere la diversa utilización de los diferentes genes variables humanos contenidos en los YAC yH2 e yK2. La diversidad de los anticuerpos humanos generados por cepas de XenoMouse II se determinó mediante la clonación y la secuenciación de transcritos de la cadena pesada (μ y γ) y de la cadena ligera kappa humanas a partir de ganglios linfáticos de XenoMouse. En base a los datos que se tenían hasta la fecha, el análisis de secuencia demuestra que los XenoMouse II utilizan al menos 11 de los 37 genes V_H funcionales presentes en yH2, ocho diferentes segmentos D_H

y tres genes J_H (J_{H3} , J_{H4} y J_{H6}) (Tabla III; también se detectó J_{H5} en relación con la secuenciación de anticuerpos de hibridomas). Las secuencias V-D-J se unieron a regiones constantes μ o $\gamma 2$ humanas (no se muestran los datos).

- 5 Los genes V_H utilizados están ampliamente distribuidos por toda la región variable y representan cuatro de las siete familias de V_H (Tabla III). La utilización predominante de genes V de las familias V_{H3} y V_{H4} es similar al patrón de uso de V_H en seres humanos adultos, que es proporcional al tamaño de la familia (Yamada et al, 1991, Brezinshek et al, 1995). El uso predominante de J_{H4} también recuerda al que se detecta en células B humanas (Brezinshek et al, 1995). También se observó la adición de nucleótidos que no son de línea germinal (adiciones de N-nucleótidos), que
- 10 varían de 1-12 pb, en ambas uniones V-D y D-J. Dichas adiciones de N-nucleótidos produjeron regiones determinantes de complementariedad 3 (CDR3) con longitudes de 8 a aproximadamente 19 restos aminoácidos, que es muy comparable con la que se observa en células B humanas adultas (Yamada et al., 1991, Brezinshek et al., 1995). Dichas longitudes de CDR observadas en los XenoMouse II son mucho mayores que las longitudes de CDR3 que se observan comúnmente en ratones (Feeny, 1990).
- 15 También se descubrió un repertorio muy diverso en los diez transcritos de la cadena kappa secuenciados. Además de presentar 8 de las 25 fases de lectura abierta funcionales de V_K (ORF) presentes en $\gamma K2$, eran detectables todos los genes J_K (Tabla IV). Los diferentes genes V_K utilizados estaban muy dispersos por todo el $\gamma K2$ y representaban a las cuatro familias principales de genes V_K . Todos los productos de recombinación $V_K J_K$ estaban unidos adecuadamente a secuencias C_K . La escasez de adiciones de N-nucleótidos en los presentes transcritos coincide
- 20 con la actividad de la desoxinucleótido transferasa terminal, muy reducida en la fase de reorganización de la cadena kappa. La longitud media de CDR3 de 9-10 aminoácidos que se observaba en los transcritos de la cadena kappa es idéntica a la que se observa en células B humanas (Marks et al., 1991).
- 25 En las Tablas III y IV a continuación se presentan los análisis de repertorios de transcritos de las cadenas pesada y cadena ligera kappa humanas expresados en cepas de XenoMouse II. Los ARNm específicos de μ , γ y κ humanas se amplificaron por PCR, se clonaron y se analizaron mediante secuenciación como se describe en los Materiales y métodos. La Tabla III muestra una serie de secuencia de nucleótidos de 12 clones únicos de la cadena pesada humana divididos en segmentos V_H , D, J_H y N, como se identificaron por homología con secuencias de la línea germinal publicadas (Materiales y métodos). Cada asignación de segmento D está basada en al menos 8 bases de
- 30 homología. La Tabla IV muestra una serie de secuencias de nucleótidos de uniones V-J de 8 clones κ humanos independientes. Las secuencias se dividen en segmentos V_K , J_K y N y se identifican en base a la homología con secuencias V_K y J_K publicadas. En cada una de las Tablas se determinaron las adiciones y deleciones de N-nucleótidos (indicadas como) por la ausencia de homología de secuencia con secuencias V, D o J.

TABLA III

Análisis del repertorio de transcritos de la cadena pesada humana						
Clon	V _H	N	D _H	N	J _H	
A2.2.1	5-51 (DP73) T T A C T G T G C G A G A C A	4 (TAGG)	XP5rc A A T C A T	12 (GGGAGCTACGGG)	JH4_GACTACTGGGGC	
B2.1.5	3-33 (DP-50) T T A C T G T G C G A G A G A	7 (TCGGGGA)	3rc A A T A G C A	7 (CTGGCCT)	JH4_CTTTGA C T A C T G G G G C	
B4.2.4	3-15 (DP-38) T T A C T G T A C C A C A G A	1 (G)	K1 G G C T A C	11 (ACTAACTACCC)	JH6_C T A C T A C T A C T A C G G T	
B4.2.5	4-59 (DP-71) T T A C T G T G C G A G A G A	10 (TAGGAGTGTT)	4 G T A G T A C C A G C T G C T A T	6 (ACCCAA)	JH6_A C T A C T A C T A C T A C G G T	
D2.2.5	4-34 (DP-63) T T A C T G T G C G A G A G _	2 (GG)	NI GCAGCAGCTG	4 (CCCT)	JH4_C T T T G A C T A C T G G G G C	
D2.1.3	3-48 (DP-51) T T A C T G T G C G A G A G A	4 (TCTT)	XP1 G A T A T T T T G A C T G G T	2 (CT)	JH6_C T A C T A C T A C T A C G G T	
D2.2.8	4-31 (DP-65) T T A C T G T G C G A G A G A	2 (GA)	A4 G A C T G C A G	5 (CGGT)	JH4_T T T G A C T A C T G G G G C	
A2.2.4	3-21 (DP-77) T T A C T G T G C G A G A G A	2 (TT)	IR3 G G G G C T G G	3 (ACC)	JH6_T A C T A C T A C T A C T A C G G T	
D4.2.11	4-4/4 35 A T T A C T G T G C G A	1 (A)	N1 T A T A G C A G T G G C T G G T	2 (GT)	JH4_C T T T G A C T A C T G G G G C	
C1.2.1	1-18 (DP-14) T A T T A C T G T G C G A G _	0	XP'1/21-7 G T T A	0	JH4_G A C T A C T G G G G C	
C3.1.2	4-39 (DP-79) T A T T A C T G T G C G _	3 (GCC)	2 G G A T A T A G T A G T G G	6 (TCGGGC)	JH4_C T T T G A C T A C T G G G G C	
D2.2.7	5-51 (DP73) T T A C T G T G C G A G A C A	4 (TGGC)	K1 A G T G G C T	9 (GGTACTCTG)	JH3_A T G C T T T G A T A T C T G G G G J	

TABLA IV
Análisis del repertorio de transcritos de la cadena ligera kappa humana

Clon	V _κ	N	J _κ
F2.2.3	02 (DPK9) TTAAACGAACAGTACCCC_	0	J _κ 5 GATCACCTTCGGCCAA
F4.1.8	L5 (DPK5) ACAGGCTAACAGTTTCCTC_	0	J _κ 1_ GGACGTTTCGGCCAA
F4.1.6	A20 (DPK4) AAGTATAACAGTGCCCC_	0	J _κ 3 ATTCACCTTCGGCCCT
F2.2.5	08 ACAGTATGATAATCTCCC_	0	J _κ 4 GCTCACTTTCGGCGGA
F2.1.5	L1 AAAGTATAATAGTTACCC_	0	J _κ 5 GATCACCTTCGGCCAA
F2.1.4	A30 CAGCATAATAGTTACCC_	0	J _κ 3 ATTCACCTTCGGCCCT
F2.1.3	B3 (DPK24) AATATTATAGTACTCC_	0	J _κ 4 GCTCACTTTCGGCGGA
F4.1.3	A27 (DPK22) CAGTATGGTAGCTCACCTC	1 (G)	J _κ 2 _CACTTTTGCCAG

Estos resultados, junto con las secuencias de hibridomas derivados de XenoMouse, que se describen posteriormente, demuestran una utilización muy diversa de tipo humano adulto de genes V, D y J, que parece demostrar que la totalidad de las regiones variables de las cadenas pesada y kappa humanas presentes en los YAC yH2 e yK2 están accesibles para el sistema del ratón para la reorganización de anticuerpos y se están utilizando de una forma no basada en la posición. Además, la longitud media de las adiciones de N-nucleótidos y de CDR3 para los transcritos tanto de la cadena pesada como de la kappa es muy similar a la que se observa en células B humana adultas, indicando que el ADN del YAC contenido en los ratones dirige la maquinaria del ratón para producir un repertorio inmune de tipo humano adulto en ratones.

Con respecto a los siguientes ejemplos, se prepararon anticuerpos de alta afinidad contra varios antígenos. En particular, se prepararon anticuerpos contra IL-8 humana y EGFR humano. Los fundamentos para la selección de IL-8 y EGFR son los siguientes.

IL-8 es un miembro de la familia de quimiocinas C-X-C. IL-8 actúa como el quimioatrayente primario para neutrófilos implicados en muchas enfermedades, incluyendo SDRA, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, glomerulonefritis, psoriasis, hepatitis alcohólica y lesión por reperusión, por nombrar algunas. Además IL-8 es un potente factor angiogénico para células endoteliales. En las Figuras 22-28 se demuestra que los anticuerpos humanos anti-IL-8 derivados de cepas de XenoMouse II son eficaces para inhibir las acciones de IL-8 en varias rutas. Por ejemplo, la Figura 22 muestra el bloqueo de la unión de IL-8 a neutrófilos humanos por anti-IL-8 humanos. La Figura 23 muestra la inhibición de la expresión de CD11b en neutrófilos humanos por anti-IL-8 humanos. La Figura 24 muestra la inhibición del flujo de entrada de calcio inducido por IL-8 mediante anticuerpos humanos anti-IL-8. La Figura 25 muestra la inhibición de la quimiotaxis de RB/293 por IL-8 mediante anticuerpos humanos anti-IL-8. La Figura 26 es un diagrama esquemático de un modelo de conejo de inflamación de la piel inducida por IL-8 humana. La Figura 27 muestra la inhibición de la inflamación de la piel inducida por IL-8 humana en el modelo de conejo de la Figura 26 con anticuerpos humanos anti-IL-8. La Figura 28 muestra la inhibición de la angiogénesis de células endoteliales en un modelo del bolsillo corneal en rata mediante anticuerpos humanos anti-IL-8.

El EGFR se considera una diana anticáncer. Por ejemplo, el EGFR está sobreexpresado hasta 100 veces en una diversidad de células cancerosas. La estimulación del crecimiento mediada por ligando (EGF y TNF) desempeña un papel crítico en el inicio y la progresión de ciertos tumores. A este respecto, los anticuerpos de EGFR inhiben la unión de ligandos y conducen a la detención del crecimiento de células tumorales y, junto con agentes quimioterapéuticos, inducen apoptosis. De hecho se ha demostrado que una combinación de Mab de EGFR da como resultado la erradicación del tumor en modelos tumorales xenogénicos murinos. Imclone ha realizado ensayos clínicos de Fase I utilizando un Mab quimérico (C225) que ha demostrado ser seguro. En las Figuras 31-33, se demuestran datos relacionados con los presentes anticuerpos humanos anti-EGFR. La Figura 30 muestra secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpos humanos anti-EGFR obtenidos de cepas de XenoMouse II. La Figura 31 muestra el bloqueo de la unión de EGF a células A431 mediante anticuerpos humanos anti-EGFR. La Figura 32 muestra la inhibición de la unión de EGF a células SW948 mediante anticuerpos humanos anti-EGFR. La Figura 33 muestra que los anticuerpos humanos anti-EGFR obtenidos de cepas de XenoMouse II inhiben el crecimiento de células SW948 *in vitro*.

Ejemplo 9: Mab humanos de alta afinidad, específicos de antígeno, producidos por XenoMouse II

La siguiente pregunta era si la utilización demostrada del gran repertorio humano en XenoMouse II podía aprovecharse para generar anticuerpos humanos contra múltiples antígenos, en particular, antígenos humanos de interés clínico significativo.

Por consiguiente, cada una de las crías individuales de XenoMouse II se expusieron a una de tres dianas antigénicas diferentes, IL-8 humana, EGFR humano y TNF- α humana. Los antígenos se administraron en dos formas diferentes, como proteína soluble en el caso de IL-8 o TNF- α o expresados en la superficie de las células (células A431) en el caso de EGFR. Para los tres antígenos, los ELISA realizados en sueros de ratones inmunizados indicaron una fuerte respuesta de anticuerpos humanos específicos de antígeno (IgG, Ig κ), con títulos tan elevados como $1,3 \times 10^6$. Se detectó una respuesta λ de ratón insignificante.

Se obtuvieron hibridomas a partir de tejidos de bazo o ganglios linfáticos mediante tecnología convencional de hibridomas y se seleccionaron por ELISA para secreción de Mab humanos específicos de antígeno.

Un XenoMouse II inmunizado con IL-8 produjo un panel de 12 hibridomas, todos los cuales secretaban Mab completamente humanos (hIgG $_{2\kappa}$) específicos para IL-8 humana. Los anticuerpos de cuatro de estos hibridomas, D1.1, K2.2, K4.2 y K4.3, se purificaron a partir de líquido ascítico y se evaluaron para determinar su afinidad por IL-8 humana y su potencia en el bloqueo de la unión de IL-8 a sus receptores en neutrófilos humanos.

Las mediciones de afinidad se realizaron mediante mediciones en fase sólida tanto de anticuerpo completo como de fragmentos Fab, usando resonancia de plasmón superficial en BIAcore y en solución mediante radioinmunoensayo (Materiales y métodos). Como se muestra en la Tabla V, los valores de afinidad medidos para los cuatro Mab variaban de $1,1 \times 10^9$ a $4,8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Aunque existía cierta variación en las técnicas empleadas, los valores de afinidad para los cuatro anticuerpos eran sistemáticamente superiores a 10^9 M^{-1} .

El análisis de ELISA confirmó que estos cuatro anticuerpos eran específicos de IL-8 humana y que no presentaban reactividad cruzada con las quimiocinas estrechamente relacionadas MIP-1 α , GRO α , β y γ , ENA-78, MCP-1 o RANTES (no se muestran los datos). Además, el análisis de competición en el BIAcore indicó que los anticuerpos reconocían al menos dos epítomos diferentes (no se muestran los datos). Todos los anticuerpos inhibían la unión de IL-8 a neutrófilos humanos tan eficazmente como el anticuerpo neutralizante murino anti-IL-8 humana, mientras que un anticuerpo de control IgG $_{2\kappa}$ humano no lo hacía (Fig. 5A).

Los experimentos de fusión con XenoMouse II inmunizados con EGFR produjeron un panel de 25 hibridomas, todos los cuales secretaban Mab IgG $_{2\kappa}$ humanos específicos de EGFR. De los trece Mab humanos analizados, cuatro (E2.1, E2.4, E2.5 y E2.11) se seleccionaron por su capacidad para competir con el anticuerpo de ratón específico de EGFR 225, que se había demostrado anteriormente que inhibía la proliferación celular mediada por EGF y la formación de tumores en ratones (Sato et al., 1983). Estos anticuerpos humanos purificados a partir de líquido ascítico se evaluaron para determinar su afinidad por EGFR y la neutralización de la unión de EGF a las células. Las afinidades de estos anticuerpos por EGFR, determinadas mediante mediciones BIAcore, variaban de $2,9 \times 10^9$ a $2,9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ (Tabla V).

Los cuatro anticuerpos anti-EGFR bloqueaban completamente la unión de EGF a células A431 (Fig. 5B), demostrando su capacidad para neutralizar su unión a receptores tanto de alta como de baja afinidad en estas células (Kawamoto et al., 1983). También se observó una inhibición completa de la unión de EGF a EGFR expresado en células humanas SW948 de carcinoma pulmonar humano mediante los cuatro anticuerpos humanos anti-EGFR (no se muestran los datos). En ambos casos los anticuerpos completamente humanos fueron tan eficaces en la inhibición de la unión de EGF como el anticuerpo de ratón anti-EGFR 225 y más potentes que el anticuerpo 528 (Gill et al., 1983). En ambos ensayos celulares, un anticuerpo de control IgG $_{2\kappa}$ humano no afectó a la unión de EGF (Fig. 5B y no se muestran los datos).

Los experimentos de fusión con XenoMouse II inmunizados con TNF- α produjeron un panel de 12 anticuerpos IgG $_{2\kappa}$ humanos. Cuatro de los 12 se seleccionaron por su capacidad para bloquear la unión de TNF- α con sus receptores en células U937 (Fig. 5C). Se determinó que las afinidades de estos anticuerpos estaban en el intervalo de $1,2$ - $3,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ (Tabla V).

Los hibridomas obtenidos de XenoMouse descritos produjeron anticuerpos a concentraciones en el intervalo de 2-19 $\mu\text{g/ml}$ en condiciones de cultivo estático. La caracterización de los anticuerpos purificados en geles de proteínas en condiciones no reductoras reveló el peso molecular aparente esperado de 150 kD para el anticuerpo IgG $_{2\kappa}$. En condiciones reductoras, se detectaron los pesos moleculares aparentes esperados de 50kD para la cadena pesada y de 25kD para la cadena ligera (datos no mostrados).

La siguiente Tabla V muestra las constantes de afinidad de Mab completamente humanos específicos de antígeno obtenidos de XenoMouse. Las constantes de afinidad de Mab IgG $_{2\kappa}$ humanos obtenidos de XenoMouse específicos para IL-8, EGFR y TNF- α se determinaron mediante BIAcore o mediante radioinmunoensayo, como se ha descrito en los Materiales y métodos. Los valores que se muestran para IL-8 y EGFR son representativos de experimentos independientes llevados a cabo con anticuerpos purificados, mientras que los valores que se muestran para TNF- α son de experimentos llevados a cabo con sobrenadantes de híbrido

TABLA V

Mab IgG _{2K} humano	Antígeno	ka (M ⁻¹ S ⁻¹)	kd (S ⁻¹)	KA (M ⁻¹)	KD (M)	Densidad superficial [RU]	Radioinmunoensayo (M ⁻¹)
Mediciones en fase sólida							Solución
D1.1	IL-8	2,7 x 10 ⁶	9,9 x 10 ⁻⁴	2,7 x 10 ⁹	3,7 x 10 ⁻¹⁰	81	2,0 x 10 ¹⁰
D1.1. Fab	IL-8	2,1 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁻³	1,1 x 10 ⁹	8,8 x 10 ⁻¹⁰	81	4,9 x 10 ¹¹
K2.2	IL-8	0,9 x 10 ⁶	2,3 x 10 ⁻⁴	4,0 x 10 ⁹	2,5 x 10 ⁻¹⁰	81	1,0 x 10 ¹⁰
K4.2	IL-8	2,5 x 10 ⁶	4,1 x 10 ⁻⁴	6,3 x 10 ⁹	1,6 x 10 ⁻¹⁰	81	ND
K4.3	IL-8	4,3 x 10 ⁶	9,4 x 10 ⁻⁴	4,5 x 10 ⁹	2,2 x 10 ⁻¹⁰	81	2,1 x 10 ¹¹
K4.3 Fab	IL-8	6,0 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁻³	2,9 x 10 ⁹	3,4 x 10 ⁻¹⁰	81	
							ELISA (M)
E1.1	EGFR	1,9 x 10 ⁶	6,5 x 10 ⁻⁴	2,9 x 10 ⁹	3,46 x 10 ⁻¹⁰	303	1,1 x 10 ⁻¹⁰
E2.5	EGFR	2,1 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁻⁴	1,2 x 10 ¹⁰	8,44 x 10 ⁻¹⁰	303	3,6 x 10 ⁻¹⁰
E2.11	EGFR	1,7 x 10 ⁶	4,7 x 10 ⁻⁴	3,7 x 10 ⁹	2,68 x 10 ⁻¹⁰	303	1,1 x 10 ⁻¹⁰
E2.4	EGFR	2,8 x 10 ⁶	9,78 x 10 ⁻⁵	2,9 x 10 ⁹	3,5 x 10 ⁻¹¹	818	1,1 x 10 ⁻¹⁰
T22.1	TNF-α	1,6 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁻³	1,2 x 10 ⁹	8,06 x 10 ⁻¹⁰	107	
T22.4	TNF-α	2,4 x 10 ⁶	4,6 x 10 ⁻⁴	5,3 x 10 ⁹	1,89 x 10 ⁻¹⁰	107	
T22.8	TNF-α	1,7 x 10 ⁶	7,5 x 10 ⁻⁴	2,3 x 10 ⁹	4,3 x 10 ⁻¹⁰	107	
T22.9	TNF-α	2,3 x 10 ⁶	4,9 x 10 ⁻⁴	4,8 x 10 ⁹	2,11 x 10 ⁻¹⁰	107	
T22.11	TNF-α	2,9 x 10 ⁶	7,9 x 10 ⁻⁴	N/A	2,76 x 10 ⁻¹⁰	107	

Ejemplo 10: Uso de genes e hipermutación somática en anticuerpos monoclonales

- 5 Las secuencias de los transcritos de las cadenas pesada y ligera kappa de los Mab humanos de IL-8 y EGFR descritos se determinaron en la Figura 6 y en las Figuras [I, II]. Los cuatro anticuerpos específicos de IL-8 están constituidos por al menos tres genes V_H diferentes (V_{H4-34}/V_{H4-21}, V_{H3-30} y V_{H5-51}), cuatro segmentos D_H diferentes (A1/A4, K1, ir3rc y 21-10rc) y dos segmentos génicos J_H (J_{H3} y J_{H4}). Se combinaron tres genes V_K diferentes (012, 018 y B3) con los genes J_{K3} y J_{K4}. Esta diversa utilización muestra que los XenoMouse II son capaces de producir un panel de anticuerpos neutralizantes anti-IL-8 con diversas regiones variables.

- Al contrario que los transcritos de anticuerpo de IL-8, las secuencias de anticuerpos seleccionadas por su capacidad para competir con el Mab 225 demostraron un uso de genes V_H y V_K relativamente restringido, compartiendo tres anticuerpos, E1.1, E2.4 y E2.5, el mismo gen V_H (4-31) y conteniendo E2.11 V_{H4-61}, que tiene una elevada homología con V_{H4-31}. Se detectaron diferentes segmentos D (2, A1/a2, XP1) y J_H (J_{H3}, J_{H4}, J_{H5}). Los cuatro anticuerpos demostraron que compartían el mismo gen V_K (018). Tres de ellos contenían J_{K4} y uno, E2.5, contenía J_{K2}.

- La mayoría de los transcritos de hibridomas V_H y V_K demostraron grandes cambios de nucleótidos (7-17) a partir de los correspondientes segmentos de línea germinal, mientras que no se detectaron mutaciones en las regiones constantes. La mayoría de las mutaciones en segmentos V dieron como resultado sustituciones de aminoácidos en las secuencias de aminoácidos de anticuerpos predichas (0-12 por gen V), muchas en regiones CDR1 y CDR2 (Figura 7). Son dignas de mención las mutaciones que están compartidas por las secuencias de la cadena pesada de anticuerpos de EGFR, tales como la sustitución Gly-Asp en CDR1, que comparten todos los anticuerpos, o la sustitución Ser-Asn en CDR2 y Val-Leu en la región marco conservada 3, que comparten tres anticuerpos. Estos resultados indicaban que se está produciendo un amplio proceso de hipermutación somática, que conduce a la maduración y la selección de anticuerpos, en XenoMouse II.

Discusión

- 30 Esta presente solicitud describe la primera sustitución funcional de loci complejos, del tamaño de megabases de ratón, con fragmentos de ADN humanos equivalentes en tamaño y contenido reconstruidos en YAC. Con este enfoque, el sistema inmune humoral del ratón se "humanizó" con loci de Ig humanas del tamaño de megabases para reproducir sustancialmente la respuesta de anticuerpos humanos en ratones deficientes para la producción de anticuerpos endógenos.

- 35 El éxito en la reconstrucción fiel de una gran parte de los loci de las cadenas pesada y ligera kappa humanas, casi en una configuración de línea germinal, establece que la recombinación de YAC en levaduras es una tecnología poderosa para reconstituir fragmentos grandes, complejos e inestables, tales como los loci de Ig (Méndez et al., 1995) y manipularlos para su introducción en células de mamíferos. Además, la introducción con éxito de dos grandes segmentos de las cadenas pesada y ligera kappa en la línea germinal de ratón en una forma intacta confirma que la metodología de la fusión de esferoplastos de levaduras con células ES es un enfoque fiable y eficaz para incorporar loci xenogénicos en la línea germinal de ratón.

La caracterización de cepas de XenoMouse II ha demostrado que los grandes loci de Ig fueron capaces de restaurar el sistema de anticuerpos, de forma comparable en su diversidad y funcionalidad a la de ratones de tipo silvestre y muy superior a la respuesta humoral producida en ratones que llevan construcciones de minigenes de Ig humanas (Lonberg et al., 1994) o pequeños YAC de Ig humanas (Green et al., 1994). Esta diferencia se manifestó a nivel de células B maduras, producción de Ig humanas, eficacia de cambio de clase, diversidad, predominio de la producción de Ig κ humana sobre la de Ig λ murina y magnitud de la respuesta de anticuerpos humanos, y éxito en la generación de anticuerpos monoclonales de alta afinidad específicos de antígeno contra múltiples antígenos.

Los niveles de células B maduras y anticuerpos humanos en XenoMouse II son los mayores que se han publicado hasta ahora para ratones transgénicos para Ig, representando un aumento de varias veces por encima de los niveles que se han demostrado para ratones anteriores y que se acercan a los de ratones de tipo silvestre. En particular, los niveles de la IgG humana fueron más de 100 veces superiores a los publicados para ratones que llevan minilocus de transgenes de Ig con el gen $\gamma 1$ humano (Lonberg et al., 1994). El cambio de clase más eficaz en XenoMouse II fue probablemente el resultado de la inclusión de las regiones de cambio de clase completas, con todos sus elementos reguladores, así como de la adición de elementos de control en yH2, que pueden ser importantes para facilitar y mantener un cambio de clase apropiado. Los niveles elevados de células B maduras en cepas de XenoMouse II son probablemente el resultado de la mayor frecuencia de reorganización y, por lo tanto, del desarrollo de células B mejorado en la médula ósea debido al aumento del repertorio de genes V. Se espera que la reconstitución de células B sea aún más pronunciada en cepas de XenoMouse II que sean homocigotos para el locus de la cadena pesada humana.

La relación entre la expresión de la cadena κ humana y la cadena ligera λ de ratón por células B circulantes proporciona una medida interna útil de la utilización del locus de la cadena kappa transgénico. Mientras que en ratones que contenían un alelo de YAC de Ig más pequeño se observó una distribución aproximadamente igual de κ humana y λ de ratón, se detectó un predominio significativo de κ humana en cepas de XenoMouse II. Además, los animales homocigotos para yK2 poseían una relación $\kappa:\lambda$ que es idéntica a la de ratones de tipo silvestre. Estas observaciones, junto con el amplio uso de genes V κ , sugieren con fuerza que los genes V κ proximales humanos en el XenoMouse II son suficientes para facilitar una respuesta de la cadena ligera variada y son coherentes con la predisposición hacia el uso de genes V κ proximales en humanos (Cox et al., 1994).

Las cepas de XenoMouse II presentaban una diversidad de anticuerpos muy aumentada, con genes V, D y J por toda la extensión de los loci a los que accede el mecanismo de recombinación y que se incorporaran en anticuerpos maduros. Una vez desencadenado por la unión al antígeno, se produce una amplia hipermutación somática que conduce a la maduración por afinidad de los anticuerpos.

El patrón de utilización de genes V, D y J en XenoMouse II también indicaba que están disponibles y se utilizan de una forma que recuerda a su utilización en humanos, produciendo un repertorio de anticuerpos humanos de tipo adulto, que es diferente del tipo fetal y del uso basado en la posición observado en ratones que llevan minigenes de Ig (Taylor et al., 1992; Taylor et al., 1994; Tuailon et al., 1993). La amplia utilización de muchos de los genes V H y V κ funcionales, junto con la gran diversidad de antígenos reconocidos por los ratones, subrayan la importancia del gran repertorio de genes V para reconstituir con éxito una respuesta de anticuerpos funcional.

El último ensayo para determinar el grado de reconstitución de la respuesta inmune humana en ratones es el abanico de antígenos contra los que los ratones provocarán una respuesta de anticuerpos y la facilidad con la que pueden generarse Mab de alta afinidad específicos de antígeno contra diferentes antígenos. Al contrario que ratones modificados por ingeniería genética con YAC de Ig humanas más pequeños o minigenes, que producían hasta la fecha sólo un limitado número de Mab humanos específicos de antígeno (Lonberg et al., 1994; Green et al., 1994; Fishwild et al., 1996), los XenoMouse II generaron Mab contra todos los antígenos humanos que se han ensayado hasta la fecha. Las cepas de XenoMouse II produjeron una fuerte respuesta de anticuerpos humanos contra diferentes antígenos humanos, presentados como proteínas solubles o expresados en las superficies de las células. La inmunización con cada uno de los tres antígenos humanos ensayados produjo un panel de 10-25 Mab IgG $_{2\kappa}$ humanos específicos de antígeno. Para cada antígeno, se obtuvo un conjunto de anticuerpos con afinidades en el intervalo de 10^9 - 10^{10} M $^{-1}$. Se realizaron varias mediciones para confirmar que los valores de afinidad representaban cinéticas de unión univalente en lugar de adividez: se llevaron a cabo ensayos BIAcore con anticuerpos intactos con microplacas detectoras recubiertas con antígeno a una baja densidad para minimizar la probabilidad de unión bivalente; para dos anticuerpos, el ensayo se repitió con fragmentos Fab monovalentes; algunos de los anticuerpos también se ensayaron mediante solución de radioinmunoensayo. A partir de los resultados de estas mediciones se concluye que con el XenoMouse se obtienen fácilmente anticuerpos con afinidades en el intervalo de 10^{10} M $^{-1}$. Los valores de afinidad obtenidos para anticuerpos obtenidos de XenoMouse son los mayores que se han publicado para anticuerpos humanos contra antígenos humanos producidos a partir de ratones obtenidos por ingeniería genética (Lonberg et al., Fishwild et al., 1996) o a partir de bibliotecas combinatorias (Vaughan et al., 1996). Estas altas afinidades, junto con la amplia sustitución de aminoácidos como resultado de la mutación somática en los genes V, confirman que el mecanismo de maduración por afinidad está intacto en el XenoMouse II y es comparable al de los ratones de tipo silvestre.

Estos resultados demuestran que se está aprovechando adecuadamente el gran repertorio de anticuerpos en los YAC de Ig humanas por la maquinaria del ratón para la diversificación y la selección de anticuerpos y, debido a la falta de tolerancia inmunológica contra proteínas humanas, pueden producir anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluyendo antígenos humanos. La facilidad con la que pueden generarse anticuerpos contra antígenos humanos mediante los genes de inmunoglobulinas humanas en estos ratones proporciona una confirmación adicional de que la autotolerancia a nivel de células B se adquiere y no se hereda.

La capacidad de generar anticuerpos completamente humanos de alta afinidad contra antígenos humanos tiene evidentes implicaciones prácticas. Se espera que los anticuerpos completamente humanos minimicen las respuestas inmunológicas y alérgicas intrínsecas a los Mab de ratón o derivatizados de ratón y, por lo tanto, aumenten la eficacia y la seguridad de los anticuerpos administrados. Los XenoMouse II ofrecen la oportunidad de proporcionar una ventaja sustancial en el tratamiento de enfermedades humanas crónicas y recurrentes, tales como inflamación, autoinmunidad y cáncer, que requieren administraciones de anticuerpos repetidas. La rapidez y la reproducibilidad con la que los XenoMouse II producen un panel de anticuerpos completamente humanos de alta afinidad indican el avance potencial que ofrecen sobre otras tecnologías para la producción de anticuerpos humanos. Por ejemplo, al contrario que la presentación de fagos, que requiere grandes esfuerzos para mejorar la afinidad de muchos de sus anticuerpos derivados y produce cadenas de Fv sencillas o Fab, los anticuerpos de XenoMouse II son inmunoglobulinas completamente intactas de alta afinidad que pueden producirse a partir de hibridomas sin ninguna ingeniería genética adicional.

La estrategia que se describe en este documento para la creación de un sistema inmune humoral humano auténtico en ratones puede aplicarse para la humanización de otros loci multigénicos, tales como el receptor de células T o el complejo mayor de histocompatibilidad, que gobiernan otros compartimentos del sistema inmune del ratón (Jakobovits, 1994). Dichos ratones serían valiosos para aclarar las relaciones estructura-función de los loci humanos y su implicación en la evolución del sistema inmune.

BIBLIOGRAFÍA:

Abertsen et al., "Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library containing seven haploid human genome equivalents." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 4256 (1990).

Anand et al., "Construction of yeast artificial chromosome libraries with large inserts using fractionation by pulsed-field gel electrophoresis." *Nucl. Acids Res.* 17: 3425-3433 (1989).

Berman et al., "Content and organization of the human Ig VH locus: definition of three new V_H families and linkage to the Ig C_H locus." *EMBO J.* 7: 727-738 (1988).

Brezinschek et al., "Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B-cells using single-cell polymerase chain reaction." *J. Immunol.* 155: 190-202 (1995).

Brownstein et al., "Isolation of single-copy human genes from a library of yeast artificial chromosome clones." *Science* 244: 1348-1351 (1989).

Bruggemann et al., *PNAS USA* 86: 6709-6713 (1989).

Bruggemann et al., "Human antibody production in transgenic mice: expression from 100 kb of the human IgH locus." *Eur. J. Immunol* 21: 1323-1326 (1991).

Bruggeman, M. y Neuberger, M. S. en *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 2: 159-165 (Lerner et al. eds. Academic Press (1991)).

Bruggemann, M. y Neuberger, M. S. "Strategies for expressing human antibody repertoires in transgenic mice." *Immunology Today* 17: 391-397 (1996).

Chen et al., "Immunoglobulin gene rearrangement in B-cell deficient mice generated by targeted deletion of the J_H locus" *International Immunology* 5: 647-656 (1993).

Choi et al., "Transgenic mice containing a human heavy chain immunoglobulin gene fragment cloned in a yeast artificial chromosome" *Nature Genetics* 4: 117-123 (1993).

Coligan et al., Unidad 2.1, "Enzyme-linked immunosorbent assays," en *Current protocols in immunology* (1994).

Cook, G. P. y Tomlinson, I. M., "The human immunoglobulin V_H repertoire." *Immunology Today* 16: 237-242 (1995).

- Cox et al., "A directory of human germ-line Vx segments reveals a strong bias in their usage." *Eur. J. Immunol.* 24: 827-836 (1994).
- Dariavach et al., "The mouse IgH 3'-enhancer." *Eur. J. Immunol.* 21: 1499-1504 (1991).
- 5 Den Dunnen et al., "Reconstruction of the 2.4 Mb human DMD-gene by homologous YAC recombination." *Human Molecular Genetics* 1: 19-28 (1992).
- Feeney, A. J. "Lack of N regions in fetal and neonatal mouse immunoglobulin V-D-J junctional sequences." *J. Exp. Med.* 172: 137-1390 (1990).
- 10 Fishwild et al., "High-avidity human IgGκ monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice." *Nature Biotech.* 14: 845-851 (1996).
- 15 Flanagan, J. G. y Rabbitts, T. H., "Arrangement of human immunoglobulin heavy chain constant region genes implies evolutionary duplication of a segment containing γ, ε, and α genes." *Nature* 300: 709-713 (1982).
- Galfre, G. y Milstein, C., "Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures." *Methods Enzymol.* 73: 3-46 (1981).
- 20 Gemmill et al., "Protocols for pulsed field gel electrophoresis: Separation and detection of large DNA molecules." *Advances in Genome Biology* 1: 217-251 (1991).
- 25 Gill et al., "Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibodies which are inhibitors of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factorstimulated tyrosine protein kinase activity." *J. Biol. Chem.* 259: 7755 (1984).
- Green et al., "Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs." *Nature Genetics* 7: 13-21 (1994).
- 30 Hermanson et al., "Rescue of end fragments of yeast artificial chromosomes by homologous recombination in yeast." *Nucleic Acids Res.* 19: 4943-4948 (1991).
- 35 Huber et al., "The human immunoglobulin κ locus. Characterization of the partially duplicated L regions" *Eur. J. Immunol.* 23: 2860-2967 (1993).
- Jakobovits, A., "Humanizing the mouse genome." *Current Biology* 4: 761 -763 (1994).
- 40 Jakobovits, A., "Production of fully human antibodies by transgenic mice" *Current Opinion in Biotechnology* 6: 561-566 (1995).
- Jakobovits et al., "Germ-line transmission and expression of a human-derived yeast artificial-chromosome." *Nature* 362: 255-258 (1993).
- 45 Jakobovits, A. et al., "Analysis of homozygous mutant chimeric mice: Deletion of the immunoglobulin heavy-chain joining region blocks B-cell development and antibody production" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551-2555 (1993).
- Kawamoto et al., "Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: Identification of high affinity receptors for EGF by an anti-receptor monoclonal antibody." *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 80: 1337-1341 (1983).
- 50 Lonberg et al., "Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications." *Nature* 368: 856-859 (1994).
- 55 Lusti-Marasimhan et al., "Mutation of Leu25 and Val27 introduces CC chemokine activity into interleukin-8." *J. Biol. Chem.* 270: 2716-2721 (1995).
- Marks et al., "Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes" *Eur. J. Immunol.* 21: 985-991(1991).
- 60 Matsuda et al., "Structure and physical map of 64 variable segments in the 3' 0.8-megabase region of the human immunoglobulin heavy-chain locus." *Nature Genetics* 3: 88-94 (1993).
- Max, E. *Molecular genetics of immunoglobulins. Fundamental Immunology.* 315-382 (Paul, W. E., ed., Nueva York: Raven Press (1993)).
- 65 Méndez et al., "A set of YAC targeting vectors for the interconversion of centric and acentric arms." *Cold*

Spring Harbor Laboratory Press, *Genome Mapping and Sequencing meeting*, 163 (1993).

Méndez et al., "Analysis of the structural integrity of YACs comprising human immunoglobulin genes in yeast and in embryonic stem cells." *Genomics* **26**: 294-307 (1995).

Ray, S. y Diamond, B., "Generation of a fusion partner to sample the repertoire of Splenic B-cells destined for apoptosis." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5548-5551 (1994).

Sato et al., "Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors" *Mol. Biol. Med.* **1**: 511-529 (1983).

Schiestl, R. H. y Gietz, R. D., "High efficiency transformation of intact yeast cells using stranded nucleic acids as a carrier." *Curr. Genet.* **16**: 339-346 (1989).

Sherman et al., "Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics." (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1986)).

Silverman et al., "Meiotic recombination between yeast artificial chromosomes yields a single clone containing the entire BCL2 protooncogene." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9913-9917 (1990).

Srivastava, A. y Schlessinger, D., "Vectors for inserting selectable markers in vector arms and human DNA inserts of yeast artificial chromosomes (YACs)" *Gene* **103**: 53-59 (1991).

Taylor et al., "A transgenic mouse that expresses a diversity of human sequence heavy and light chain immunoglobulins." *Nucleic Acids Research* **20**: 6287-6295 (1992).

Taylor et al., "Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutation and class switching in mice that lack endogenous IgM." *International Immunology* **6**: 579-591 (1994).

Tuaillon et al., "Human immunoglobulin heavy-chain minilocus recombination in transgenic mice: gene-segment use in μ and γ transcripts." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 3720-3724 (1993).

Tuaillon et al., "Analysis of direct and inverted DJ_H rearrangements in a human Ig heavy chain transgenic minilocus" *J. Immunol.* **154**: 6453-6465 (1995).

Vaughan et al., "Human antibodies with subnanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library." *Nature Biotech.* **14**: 309-314 (1996).

Wagner et al., "The diversity of antigen-specific monoclonal antibodies from transgenic mice bearing human immunoglobulin gene miniloci." *Eur. J. Immunol.* **24**: 2672-2681 (1994).

Weichhold et al., "The human immunoglobulin κ locus consists of two copies that are organized in opposite polarity." *Genomics* **16**: 503-511 (1993).

Yamada, M. et al., "Preferential utilization of specific immunoglobulin heavy chain diversity and joining segments in adult human peripheral blood B lymphocytes." *J. Exp. Med.* **173**: 395-407 (1991).

LISTADO DE SECUENCIAS

1) INFORMACIÓN GENERAL

(i) SOLICITANTE: Abgenix, Inc.

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: MAMÍFEROS TRANSGÉNICOS QUE TIENEN LOCI DE IG HUMANAS QUE INCLUYEN MÚLTIPLES REGIONES VH Y VK...

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 80

(iv) DIRECCIÓN POSTAL:

- (A) DIRECCIÓN: Fish & Neave
- (B) CALLE: 1251 Avenue of the Americas
- (C) CIUDAD: Nueva York
- (D) PAÍS: Estados Unidos
- (E) CÓDIGO POSTAL: 10020

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR

- 5 (A) TIPO DE SOPORTE: Disquete
(B) ORDENADOR: Compatible con IBM
(C) SISTEMA OPERATIVO: DOS
(D) SOFTWARE: FastSEQ Versión 1.5

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL

- 10 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 03 diciembre 1997
(C) CLASIFICACIÓN:

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR

- 15 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/759.620
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 03 diciembre 1996

(viii) INFORMACIÓN DEL MANDATARIO/AGENTE

- 20 (A) NOMBRE: James, Haley F
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 27.794
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: Cell 4.18

(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES

- 25 (A) TELÉFONO: 212-596-9000
(B) TELEFAX: 212-596-9090
(C) TELEX.

30 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 1

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 22 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- 45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 1
CAGGTGCAGC TGGAGCAGTC GG

22

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 2

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

60 (iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 2
GCTGAGGGAG TAGAGTCCTG AGGA

24

65 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 15 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 3
TTACTGTGCG AGACA

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 4

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°:4
GGGAGCTACG GG 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 5

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 5
GACTACTGGG GC 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 6

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 15 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
65 (vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 6

TTACTGTGCG AGAGA

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 7

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 16 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 7

CTTTGACTAC TGGGGC

16

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 8

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 15 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 8

TTACTGTACC ACAGA

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 9

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 11 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 9

ACTAACTACC C

11

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 10

55

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 16 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

60

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:

65

(vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 10
CTACTACTAC TACGGT 16

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 11

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10 (A) LONGITUD: 15 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 11
20 TTACTGTGCG AGAGA 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 12

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 10 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 12
TAGGAGTGTT 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 13

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
45 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
50 (iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 13
GTAGTACCAG CTGCTAT 17

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 14

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60 (A) LONGITUD: 17 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 14
 5 ACTACTACTA CTACGGT 17

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 14 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 15
 20 TTACTGTGCG AGAG 14

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 16

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 16
 40 GCAGCAGCTG 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 17

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 17
 55 CTTTGACTAC TGGGGC 16

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 18

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 5 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 18
 TTACTGTGCG AGAGA 15
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 19
- 10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 15 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 15 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 20 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 19
 GATATTTTGA CTGGT 15
- 25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 20
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 30 (A) LONGITUD: 16 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 20
 CTACTACTAC TACGGT 16
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 21
- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 15 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 50 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 55 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 21
 TTACTGTGCG AGAGA 15
- 60 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 22
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 15 pares de bases
 65 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 22

TTTGACTACT GGGGC

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 23

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 23

TTACTGTGCG AGAGA

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 24

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 24

TACTACTACT ACTACGGT

18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 25

ATTACTGTGC GA

12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 26

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 26
TATAGCAGTG GCTGGT 16

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 27

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 16 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
20 (D) TOPOLOGÍA: lineal
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
25 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 27
CTTTGACTAC TGGGGC 16

30 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 28

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 14 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
35 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
40 (iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 28
TATTACTGTG CGAG 14

45 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 29

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
50 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
55 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 29
GACTACTGGG GC 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 30

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 5
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
10 (vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 30
TATTACTGTG CG 12
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 31
- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 14 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
20 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
25 (iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 31
GGATATAGTA GTGG 14
- 30 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 32
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 35 (A) LONGITUD: 16 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 32
CTTTGACTAC TGGGGC 16
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 33
- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 15 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
55 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
60 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 33
TTACTGTGCG AGACA 15
- 65 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 34

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 34
ATGCTTTGAT ATCTGGGG 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 35

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 35
TTAAACGAAC AGTACCCC 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 36

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 16 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 36
GATCACCTTC GGCCAA 16

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 37

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 37
ACAGGCTAAC AGTTTCCCTC 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 38

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 14 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
- 15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 38
GGACGTTCCG CCAA 14

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 39

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 17 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
- 30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 39
AAGTATAACA GTGCCCC 17

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 40

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 16 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
- 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 40
ATTCACCTTC GGCCCT 16

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 41

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 18 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
- 65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 41

ACAGTATGAT AATCTCCC

18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 42

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 16 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 42

GCTCACTTTC GGCGGA

16

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 43

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 43

AAAGTATAAT AGTTACCC

18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 44

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 16 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 44

GATCACCTTC GGCCAA

16

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 45

55

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 17 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

60

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:

65

(vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 45
CAGCATAATA GTTACCC 17

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 46

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10 (A) LONGITUD: 16 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 46
20 ATTCACCTTC GGCCT 16

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 47

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 16 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 47
AATATTATAG TACTCC 16

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 48

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
45 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO
50 (iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO:
(vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 48
55 GCTCACTTTC GGCGGA 16

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 49

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60 (A) LONGITUD: 19 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 49
 5 CAGTATGGTA GCTCACCTC 19

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 50

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 0 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 50
 CACTTTTGGCCAG

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 51

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 51

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
Ser Thr Ser Thr
 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 52

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 80 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 52

Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 20 25 30
 Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 35 40 45
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 65 70 75 80

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 53

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 119 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

15

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 53

Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 20 25 30
 Glu Ile Asn Gln Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 35 40 45
 Arg Val Ile Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Thr Gln Phe Ser Leu Lys
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 65 70 75 80
 Glu Thr Pro His Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
 85 90 95
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 100 105 110
 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Thr
 115

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 54

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 120 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FUENTE ORIGINAL:

35

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 54

Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 20 25 30
 Glu Ile Ile His His Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 35 40 45
 Arg Val Ser Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Thr
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 65 70 75 80
 Gly Gly Ala Val Ala Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 85 90 95
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 100 105 110
 Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Thr
 115 120

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 55

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

- (A) LONGITUD: 84 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 55

Ser His His Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
 1 5 10 15
 Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 20 25 30
 Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro
 35 40 45
 Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr
 50 55 60
 Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Cys Ala Arg

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 56

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30

- (A) LONGITUD: 121 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 56

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 1 5 10 15
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 20 25 30
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 35 40 45
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 50 55 60
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 65 70 75 80
 Ala Arg Gln Asp Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 85 90 95
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 100 105 110
 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Thr
 115 120

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 57

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

- (A) LONGITUD: 83 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 57

Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
 1 5 10 15
 Tyr Gly Met His Trp Xaa Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 20 25 30
 Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser
 35 40 45
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Cys Ala Arg

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 58

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30

- (A) LONGITUD: 122 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 58

Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
 1 5 10 15
 Tyr Gly Met His Trp Xaa Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 20 25 30
 Val Ala Glu Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser
 35 40 45
 Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Cys Ala Arg Asp Arg Leu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 85 90 95
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 100 105 110
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Thr
 115 120

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 59

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 17 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 59

15

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 60

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 75 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (vi) FUENTE ORIGINAL:

30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 60

35

Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp
 1 5 10 15
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala
 20 25 30
 Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 35 40 45
 Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile
 50 55 60
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Asn Leu Pro
 65 70 75

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 61

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 104 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

15

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 61

Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Phe Leu Ser Trp
 1 5 10 15
 Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Ser Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 35 40 45
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val
 50 55 60
 Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Asp Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Pro
 65 70 75 80
 Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 85 90 95
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 100

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 62

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25

- (A) LONGITUD: 104 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FUENTE ORIGINAL:

35

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 62

Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp
 1 5 10 15
 Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala
 20 25 30
 Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 35 40 45
 Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile
 50 55 60
 Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Asp Asn Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 85 90 95
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 100

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 63

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 74 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

15

- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 63

Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
 1 5 10 15
 Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser
 20 25 30
 Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 35 40 45
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 50 55 60
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro
 65 70

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 64

20

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 86 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

30

- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 64

Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
 1 5 10 15
 Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser
 20 25 30
 Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 35 40 45
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 50 55 60
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly
 65 70 75 80
 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 85

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 65

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 82 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

15 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 65

Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn
 1 5 10 15
 Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
 20 25 30
 Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
 35 40 45
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 50 55 60
 Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser
 65 70 75 80
 Thr Pro

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 66

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 94 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FUENTE ORIGINAL:

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 66

Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ile Ser Asn Asn
 1 5 10 15
 Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 20 25 30
Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val Pro Asp Arg
 35 40 45
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 50 55 60
 Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp
 65 70 75 80
 Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 85 90

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 67

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

10 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

15 (iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 67

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Thr
 20

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 68

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 76 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 68

Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile
 1 5 10 15
 Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr
 20 25 30
 Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile
 35 40 45
 Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
 50 55 60
 Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 65 70 75

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 69

40

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 118 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
(vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 69

Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile
1 5 10 15
Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Asp Cys Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr
20 25 30
Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile
35 40 45
Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Thr Ser Val
50 55 60
Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Val Val
65 70 75 80
Asn Pro Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Tyr Leu Val Thr Val
85 90 95
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys
100 105 110
Ser Arg Ser Thr Ser Thr
115

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 70

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 117 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
(vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 70

Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile
1 5 10 15
Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr
20 25 30
Ser Gly Asn Thr Phe Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile
35 40 45
Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
50 55 60
Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Cys Tyr Cys Ala Arg Asn Ile Val Thr
65 70 75 80
Thr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
85 90 95
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
100 105 110
Arg Ser Thr Ser Thr
115

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 71

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 116 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
- 15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 71

Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile
 1 5 10 15
 Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr
 20 25 30
 Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Ser Met
 35 40 45
 Ser Ile Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
 50 55 60
 Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Pro Val Thr
 65 70 75 80
 Gly Gly Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85 90 95
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 100 105 110
 Ser Thr Ser Thr
 115

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 72

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 76 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
- 35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 72

Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile
 1 5 10 15
 Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr
 20 25 30
 Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile
 35 40 45
 Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
 50 55 60
 Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 65 70 75

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 73

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 76 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
(vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 73

Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile
1 5 10 15
Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr
20 25 30
Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile
35 40 45
Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
50 55 60
Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
65 70 75

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 74

- 20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 117 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
30 (vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 74

Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile
1 5 10 15
Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Leu Tyr Tyr
20 25 30
Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile
35 40 45
Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
50 55 60
Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Lys Ala Arg Asp Phe Leu Thr
65 70 75 80
Gly Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
85 90 95
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
100 105 110
Arg Ser Thr Ser Thr
115

35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 75

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 17 aminoácidos
40 (B) TIPO: aminoácido

- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
(vi) FUENTE ORIGINAL:
10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 75

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 76

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 75 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
25 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
(vi) FUENTE ORIGINAL:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 76

Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp
1 5 10 15
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala
20 25 30
Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
35 40 45
Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile
50 55 60
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Asn Leu Pro
65 70 75

- 30 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 77

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 104 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
(iii) HIPOTÉTICA: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
(vi) FUENTE ORIGINAL:
45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 77

Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp
 1 5 10 15
 Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile His Asp Ala
 20 25 30
 Ser Asn Leu Glu Thr Gly Gly Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 35 40 45
 Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro Glu Asp Ile
 50 55 60
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu Ser Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 85 90 95
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 100

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 78

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 104 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 78

15

Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Thr Ile Tyr Leu Asn Trp
 1 5 10 15
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Asn Asp Ala
 20 25 30
 Ser Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Leu Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 35 40 45
 Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile
 50 55 60
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Thr Lys Val Ala Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 85 90 95
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 100

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 79

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 104 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 79

30

35

Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp
 1 5 10 15
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala
 20 25 30
 Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 35 40 45
 Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val
 50 55 60
 Gly Thr Tyr Tyr Val Gln Gln Glu Ser Leu Pro Cys Gly Phe Gly Gln
 65 70 75 80
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 85 90 95
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 100

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 80

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 104 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 80

20

Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp
 1 5 10 15
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Asn Asp Ala
 20 25 30
 Ser Asp Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Ile Ser Gly Ser Gly Ser
 35 40 45
 Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro Glu Asp Ile
 50 55 60
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Ser Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 85 90 95
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 100

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al $\text{TNF}\alpha$ humano, o una parte de unión al antígeno de dicho anticuerpo, en el que dicho anticuerpo:
 - (a) reduce la unión del $\text{TNF}\alpha$ humano a un receptor del $\text{TNF}\alpha$ humano;
 - (b) comprende una cadena pesada de IgG2 humana;
 - (c) comprende una cadena ligera kappa humana; y
 - (d) se une al $\text{TNF}\alpha$ humano con:
 - (i) una KD menor de 2×10^{-10} M;
 - (ii) una K_a mayor de $0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$; o
 - (iii) una KD menor de 2×10^{-10} M y una K_a mayor de $0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$.
2. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o la parte de unión al antígeno se une al $\text{TNF}\alpha$ con una KD menor de 2×10^{-10} M.
3. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o la parte de unión al antígeno se une al $\text{TNF}\alpha$ con una K_a mayor de $0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$.
4. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el anticuerpo o la parte de unión al antígeno se une al $\text{TNF}\alpha$ con una KD de $1,89\text{-}8,06 \times 10^{-10}$ M.
5. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el anticuerpo o la parte de unión al antígeno se une al $\text{TNF}\alpha$ con una KA de $1,2\text{-}5,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.
6. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el anticuerpo o la parte de unión al antígeno se une al $\text{TNF}\alpha$ con una KA de $1,2\text{-}3,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.
7. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o la parte de unión al antígeno se une al $\text{TNF}\alpha$ con una KD menor de 2×10^{-10} M y una K_a mayor de $0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$.
8. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en el que el anticuerpo o la parte de unión al antígeno se une al $\text{TNF}\alpha$ con una K_a de $1,6\text{-}2,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$.
9. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en el que el anticuerpo o la parte de unión al antígeno se une al $\text{TNF}\alpha$ con una K_a mayor de $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$.
10. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el dicho anticuerpo es monoclonal.
11. El uso del anticuerpo o la parte de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la preparación de un medicamento.
12. El uso del anticuerpo o la parte de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad humana crónica o recurrente, tal como inflamación, autoinmunidad y cáncer.
13. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso como un medicamento.
14. El anticuerpo o la parte de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en el tratamiento de una enfermedad humana crónica o recurrente tal como inflamación, autoinmunidad y cáncer.
15. Un método in vitro para reducir la unión del $\text{TNF}\alpha$ humano a un receptor del $\text{TNF}\alpha$ humano que comprende la etapa de poner en contacto el $\text{TNF}\alpha$ humano con el anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
16. Un método para producir el anticuerpo humano aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende las etapas de:
 - (a) inmunizar un ratón transgénico capaz de expresar un anticuerpo completamente humano contra un antígeno de interés con el $\text{TNF}\alpha$ humano; y
 - (b) aislar el anticuerpo humano.

17. Una célula que exprese anticuerpos derivados de un ratón transgénico inmunizado por el método de acuerdo con la reivindicación 16.

5 18. La célula que expresa anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicha célula es una célula inmortalizada.

19. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en:

- 10 (a) la cadena pesada del anticuerpo humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10;
 (b) la cadena ligera del anticuerpo humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10;
 y
 (c) una parte de unión al antígeno de (a) o (b).

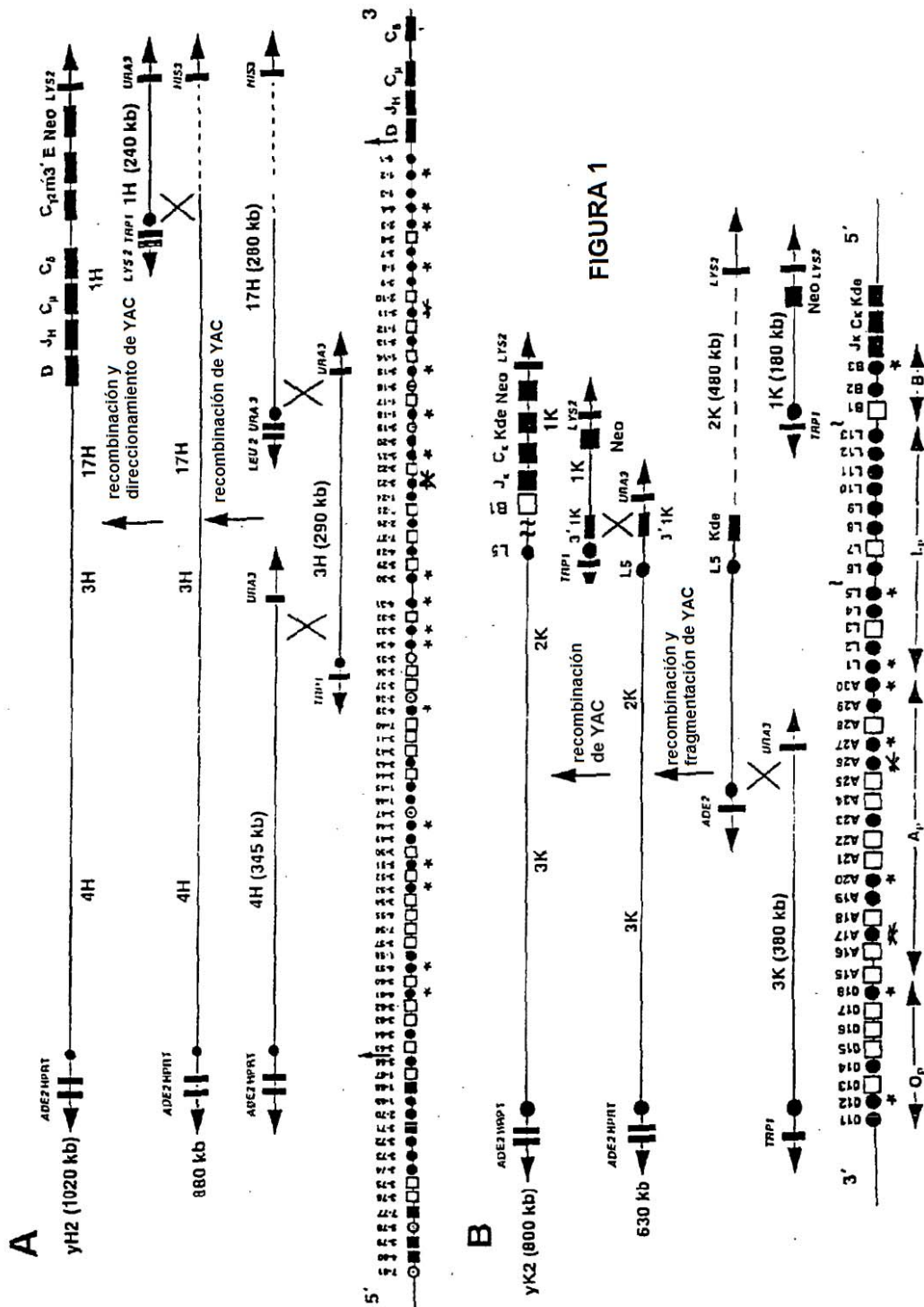
15 20. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 19.

21. Una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 19 o el vector de acuerdo con la reivindicación 20.

20 22. La célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 21, en el que la célula hospedadora comprende:

- 25 (a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o una parte de unión al antígeno del mismo; y
 (b) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o una parte de unión al antígeno del mismo.

30 23. Un método para producir el anticuerpo o la parte de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende las etapas de cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 22 y recuperar el anticuerpo.



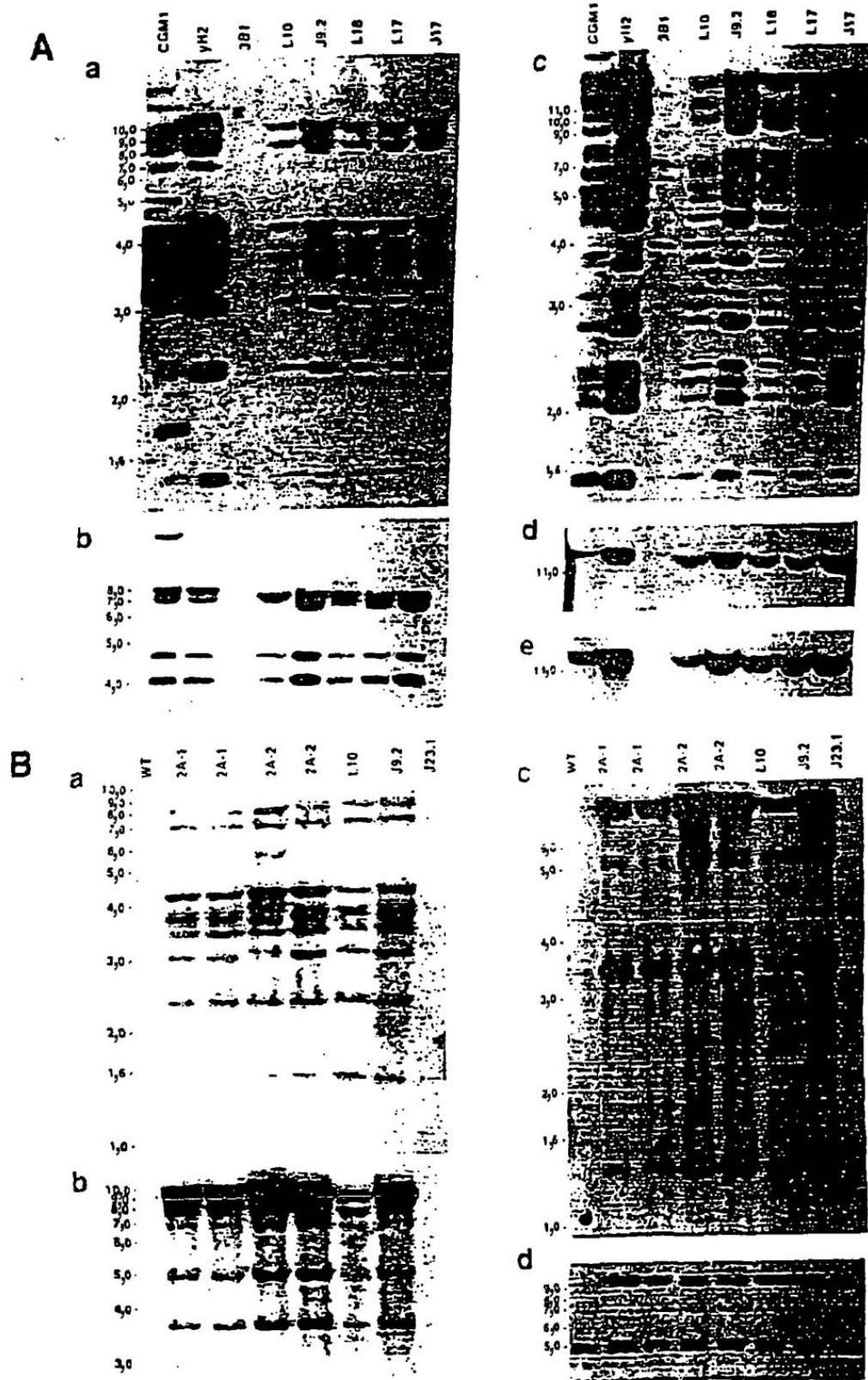


FIGURA 2

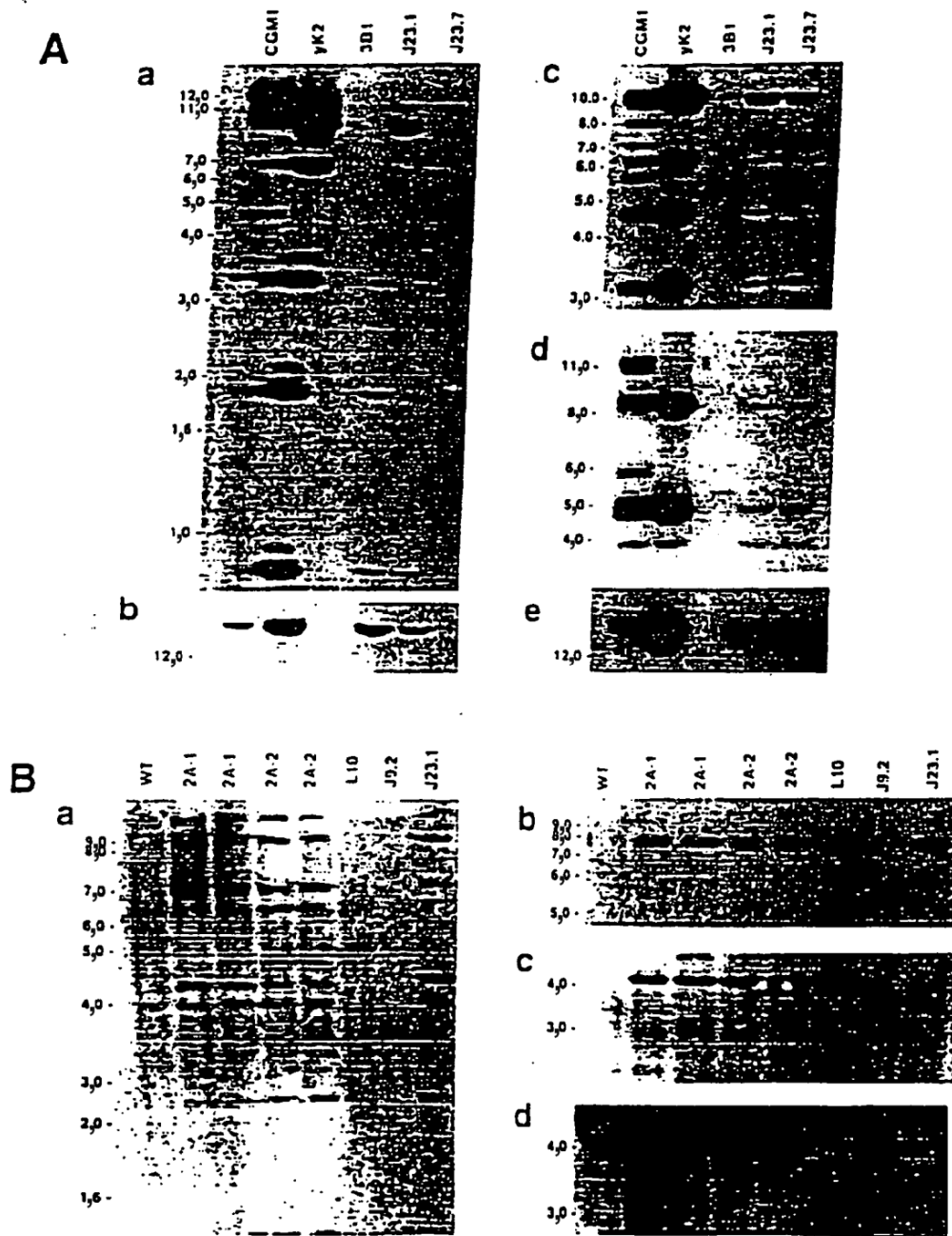


FIGURA 3

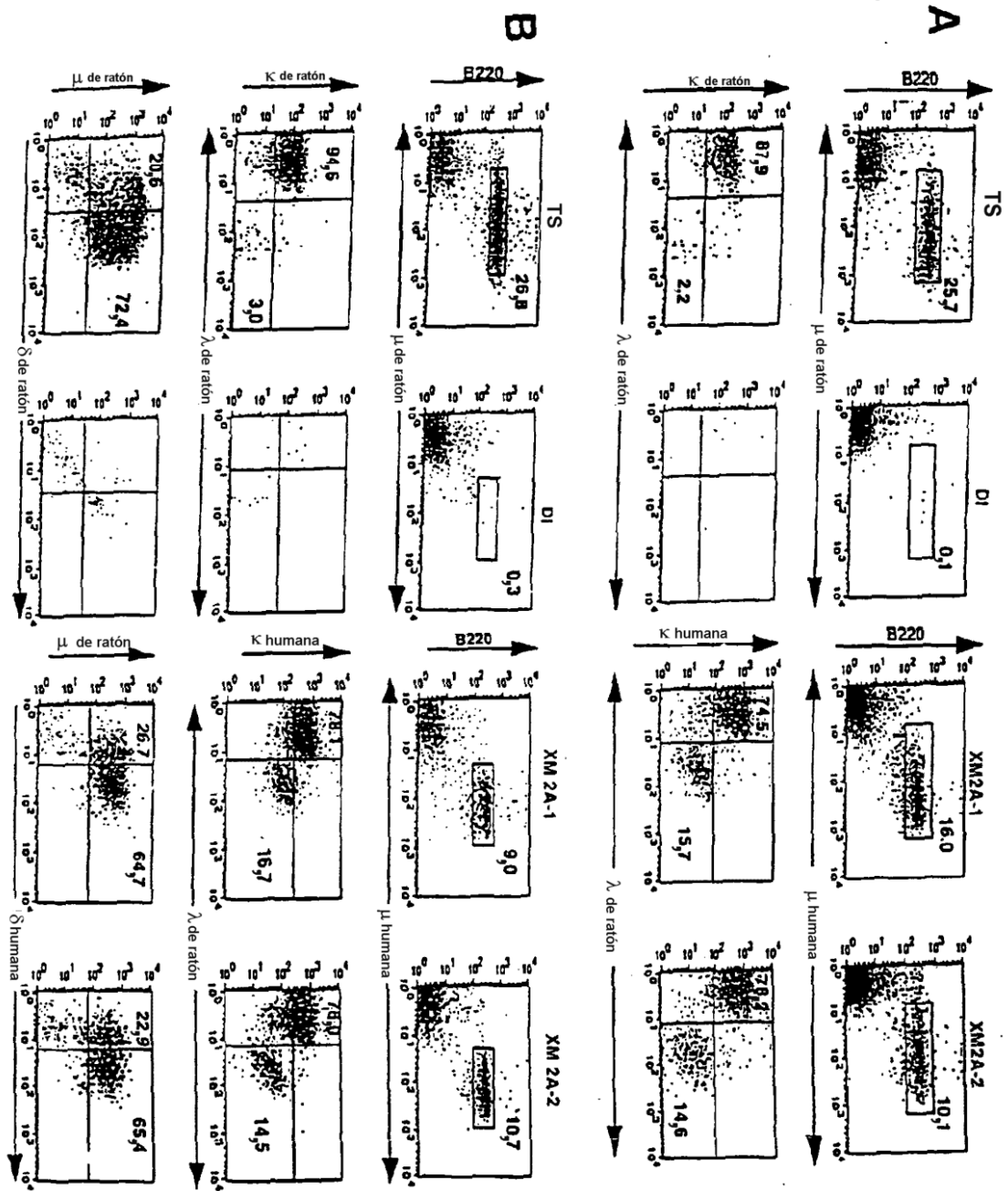
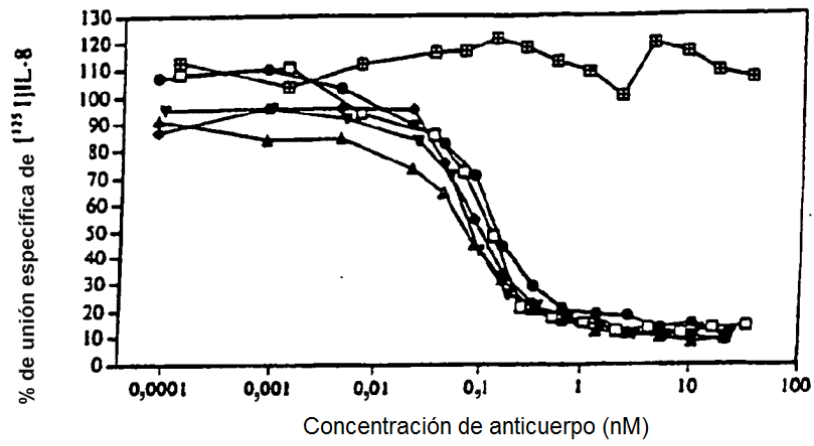
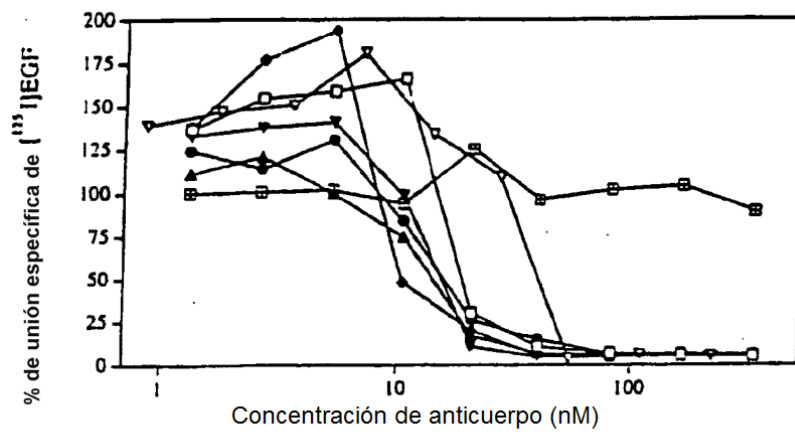


FIGURA 4

A



B



C

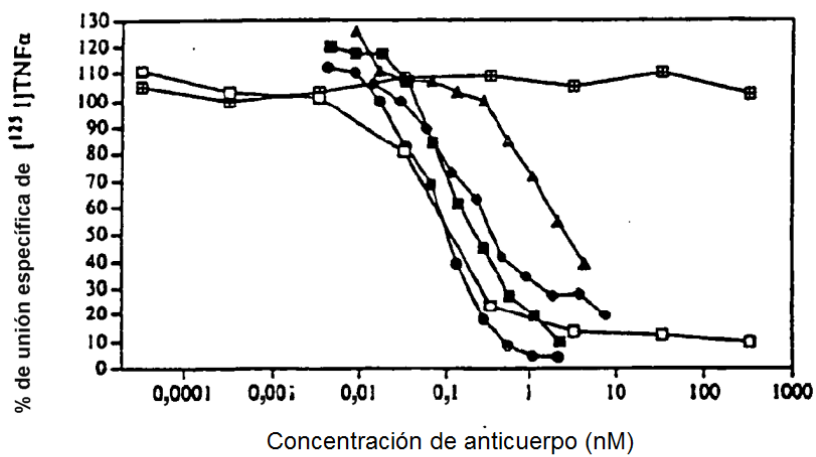
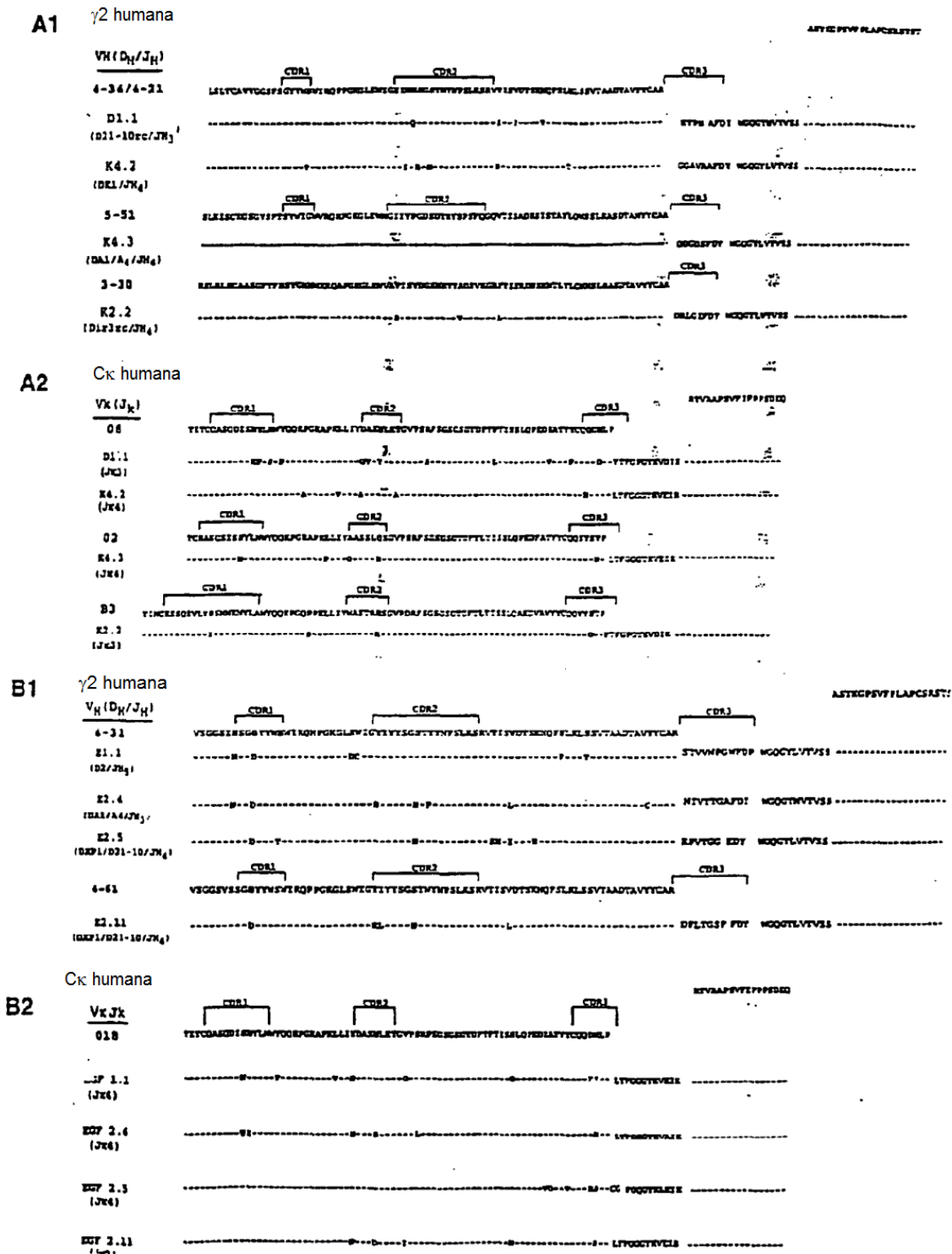


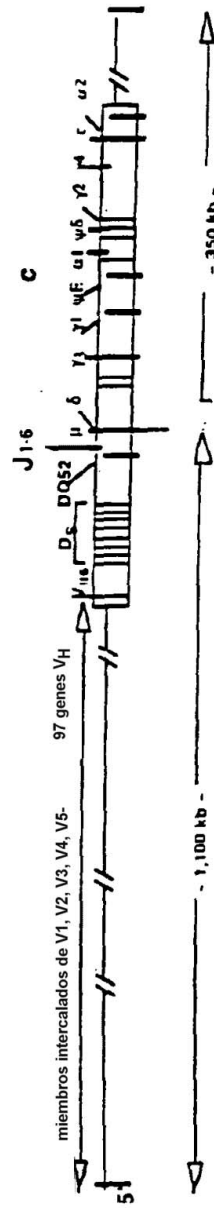
FIGURA 5

FIGURA 6



Los genes de Ig humanos residen en Loci grandes, complejos

Locus de cadena pesada humana - Cromosoma 4



Locus de cadena kappa humana - Cromosoma 2

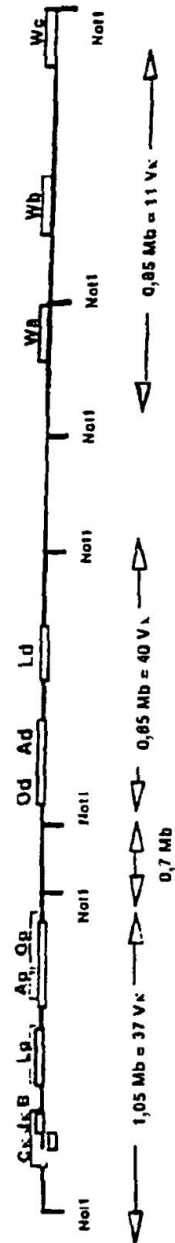


FIGURA 7

Reconstitución del locus de cadena pesada humana en un YAC sencillo

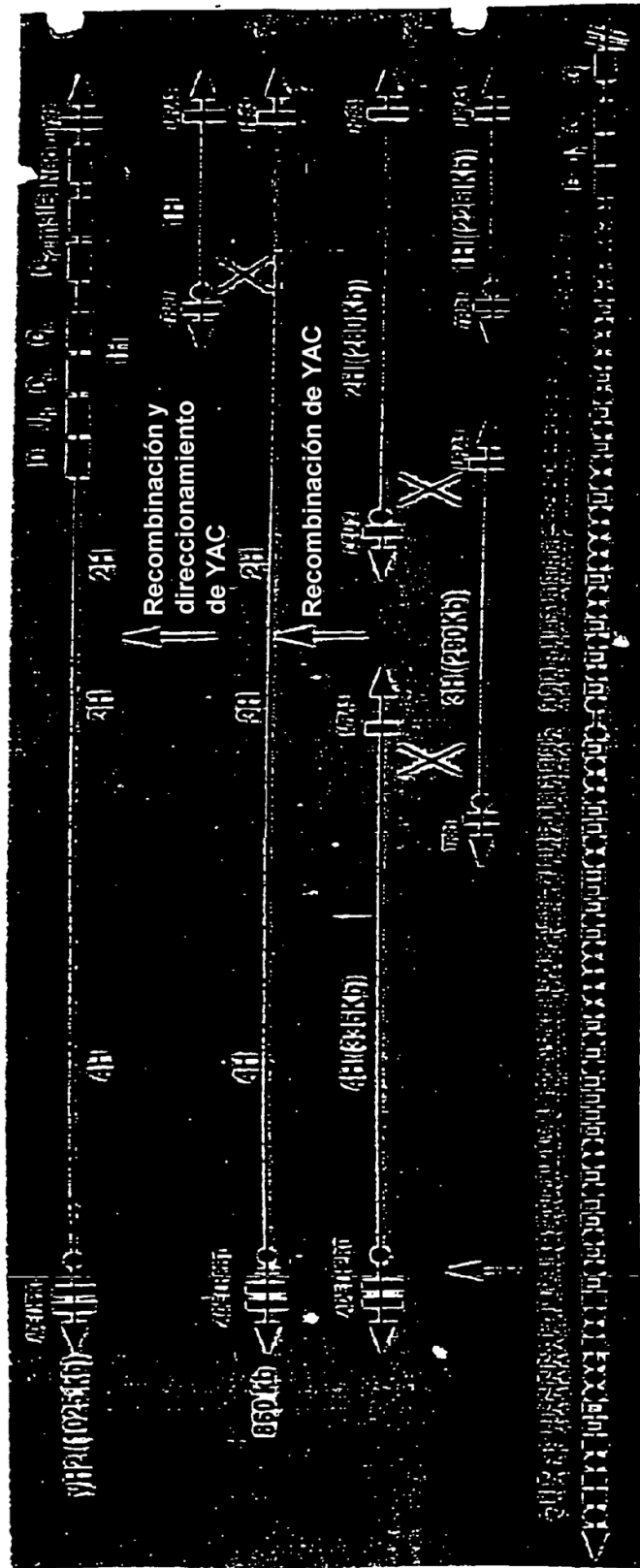


FIGURA 8

Reconstitución del locus proximal de cadena kappa humana en un YAC sencillo

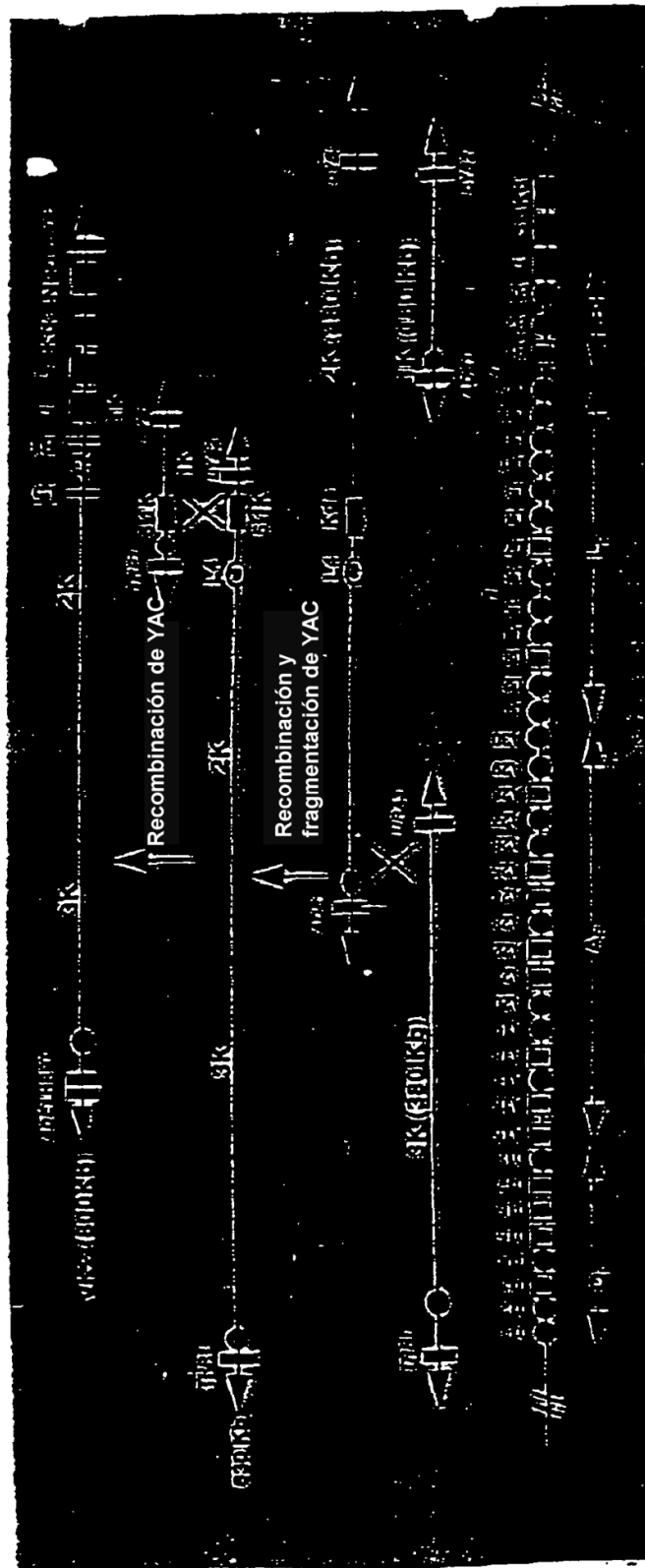


FIGURA 9

**enoMouse Fase II:
Cadena kappa humana**



● YAC de 800 kb

● ~ 32 genes V_k

FIGURA 10

El YAC de cadena pesada de 1020 kb se integra
intacto en el genoma de ratón

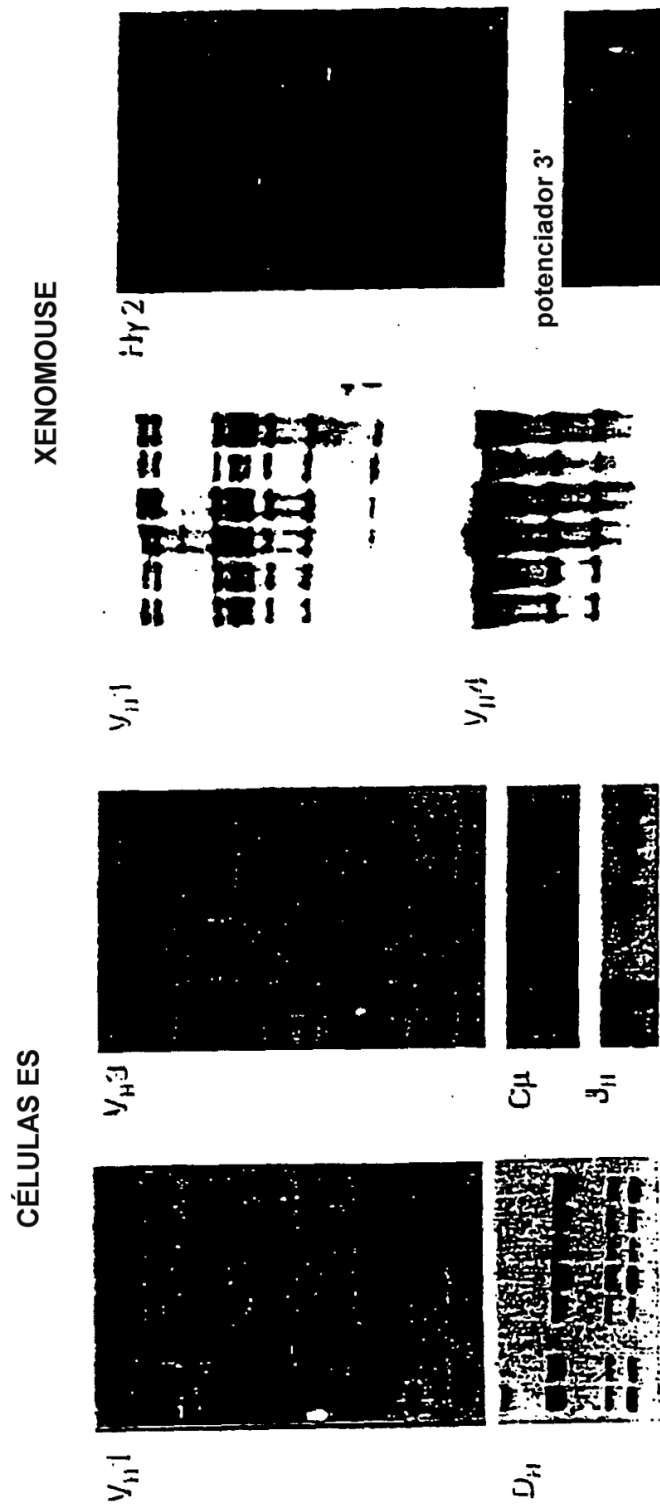


FIGURA 11

El YAC de cadena ligera kappa de 800 kb se integra
intacto en el genoma de ratón

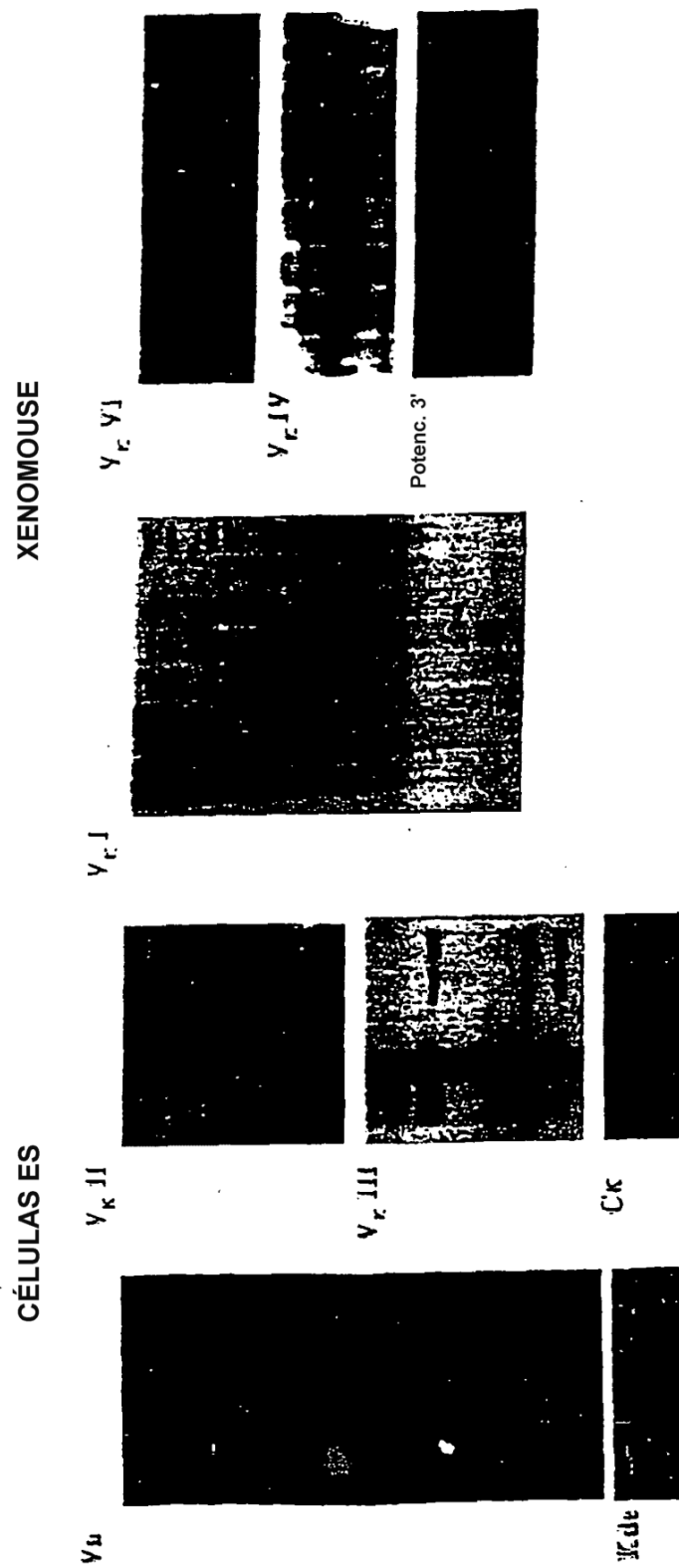


FIGURA 12

Reconstitución de células B en sangre de XenoMouse

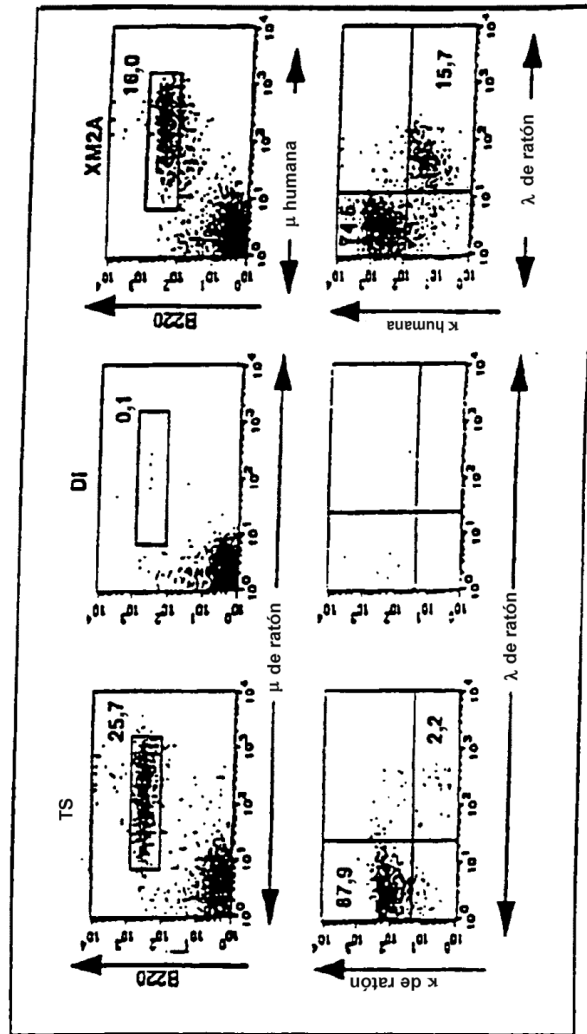


FIGURA 13

Producción de anticuerpos humanos por
XenoMouse II

XenoMouse*		Ratón de tipo silvestre (B6x129)*	
<u>(Ig humana µg/µl)</u>		<u>(Ig de ratón µg/µl)</u>	
µ	700	400	
γ	600 (hγ2)	2000	(todos los isotipos γ)
κ	800	2000	

* Mantenidos en condiciones libres de patógenos

FIGURA 14

Análisis del repertorio de transcritos de la cadena pesada humana expresados en cepas de XenoMouse II

Clon	V _H	N	D _H	N	J _H			
A2.1	5-51 (DP73)	TTACTGTGCGAGACA	4 (TAGG)	XP5ic	AATCAT	12 (GGGAGCTACGGG)	JH4	___GACTACTGGGGC
B2.1.5	3-33 (DP-50)	TTACTGTGCGAGACA	7 (TCGGGA)	3ic	AATAGCA	7 (CTGGCTT)	JH4	___CITTGACTACTGGGGC
B4.2.4	3-15 (DP-38)	TTACTGTACACACAGA	1 (G)	K1	GGGTAC	11 (ACTACTACCC)	JH8	___CTACTACTACTACGGT
B4.2.5	4-59 (DP-71)	TTACTGTGCGAGACA	10 (TAGGAGTGT)	4	G1AG1ACCACTGCTAT	6 (ACCCAA)	JH8	___ACTACTACTACTACGGT
D2.2.5	4-34 (DP-63)	TTACTGTGCGAGAG_	2 (GG)	N1	GCAGCAGCTG	4 (CCCT)	JH4	___CITTGACTACTGGGGC
D2.1.3	3-48 (DP51)	TTACTGTGCGAGACA	4 (TCTT)	XP1	GATATTTTAC1GGT	2 (CT)	JH8	___CTACTACTACTACGGT
D2.2.8	4-31 (DP-65)	TTACTGTGCGAGACA	2 (GA)	A4	GACTGCAG	5 (CGTT)	JH4	___TTTGACTAC1GGGGC
A2.2.4	3-21 (DP-77)	TTACTGTGCGAGACA	2 (TT)	IR3	GGGCTGG	3 (ACC)	JH8	___TACTACTACTACTACGGT
D4.2.11	4-44.35	ATTACTGTGCGCA	1 (A)	N1	TATAGCAGTGGCTGGT	2 (GT)	JH4	___CITTGACTACTGGGGC
C1.2.1	1-18 (DP-14)	TATTACTGTGCGAG_	0	X1*1/21.7	GTTA	0	JH4	___GACTACTGGGGC
C3.1.2	4-39 (DP-79)	TATTACTGTGCG_	3 (GCC)	2	GGATATAGTAGTGG	6 (TCGGGC)	JH4	___CITTGACTACTGGGGC
D2.2.7	5-51 (DP73)	TTACTGTGCGAGACA	4 (TGGC)	K1	AGTGGCT	9 (GGTACTCTG)	JH3	ATGCTTTTGATATCTGGGG

FIGURA 15

Análisis del repertorio de transcritos de la cadena ligera kappa expresados en cepas de XenoMouse II

Clon	V _K	N	J _K	
F2.2.3	02(DPK9)	0	JK5	GATCAGCTTCGGCCAA
F4.1.8	L5(DPK5)	0	JK1	__GGACGTTGCGGCCAA
F4.1.6	A20(DPK4)	0	JK3	ATTCAGCTTTCGGCCCT
F2.2.5	08	0	JK4	GCTCAGCTTCGGCGGA
F2.1.5	L1	0	JK5	GATCAGCTTCGGGCCAA
F2.1.4	A30	0	JK3	ATTCAGCTTTCGGCCCT
F2.1.3	B3(DPK24)	0	JK4	GCTCAGCTTCGGCGGA
F4.1.3	A27(DPK22)	1(G)	JK2	__CACITTTGGCCAG

FIGURA 16

Diversa utilización de genes V_H y V_K presentes en XenoMouse II

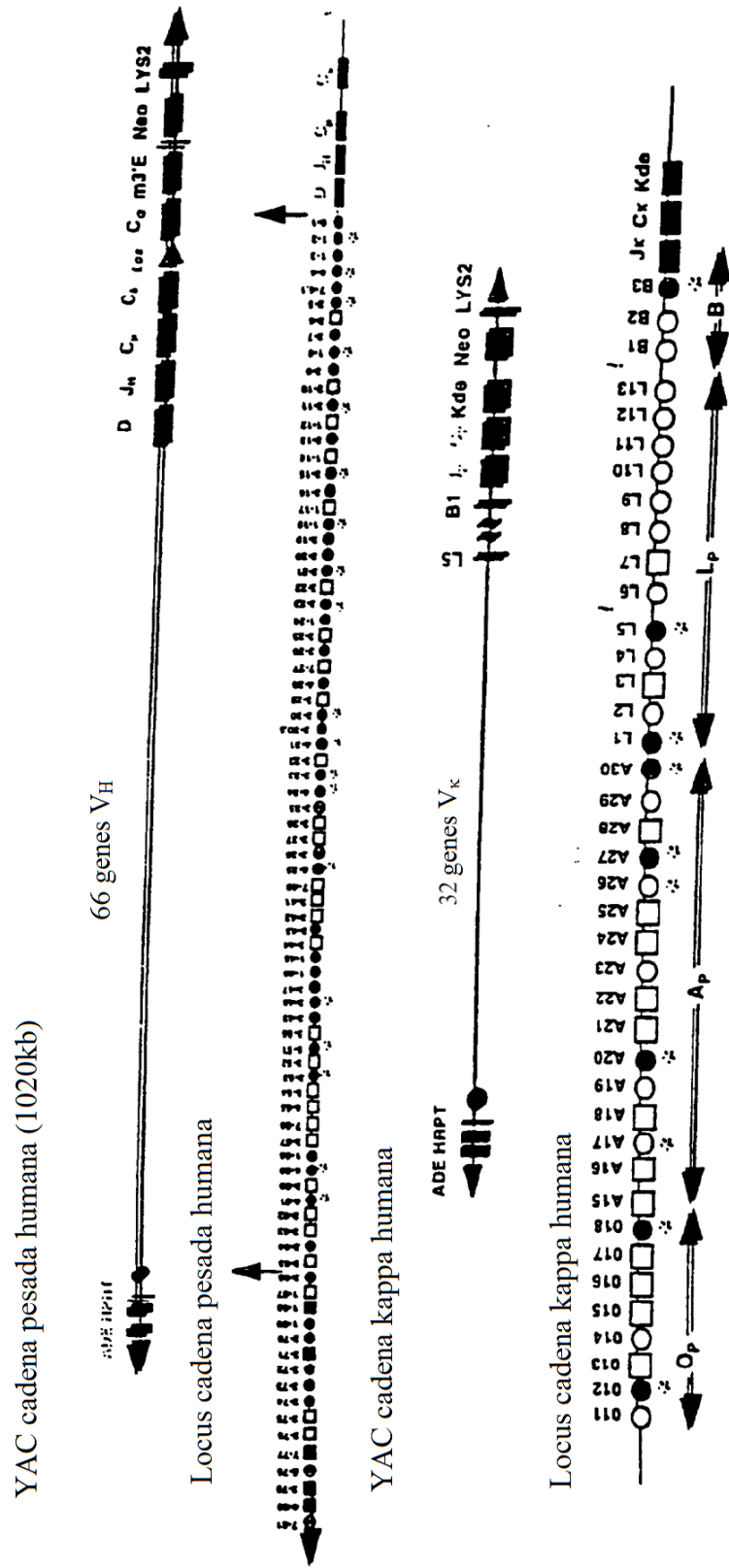


FIGURA 17

Alta respuesta de anticuerpos humanos
específicos de antígeno en XenoMouse

Título

<u>Antígeno</u>	<u>hIgM</u>	<u>hIgG</u>	<u>hIgK</u>
IL-8 humana	7 x 10 ⁵	1 x 10 ⁶	4 x 10 ⁶
EGRF humano	4 x 10 ⁵	7,5 x 10 ⁵	3 x 10 ⁶
TNFα humano	4 x 10 ⁵	4 x 10 ⁵	3 x 10 ⁵

FIGURA 18

Composición de anticuerpos anti-IL-8

Anticuerpo	VH	D	JH	VK	JK
D1.1	4 - 34	21 - 10rc	JH3	018	JK3
K2.2	4 - 21	ir3rc	JH4	B3	JK3
K4.2	3 - 30	K1	JH4	018	JK4
K4.3	5 - 51	M5-a/M5-b	JH4	012	JK4

FIGURA 19

K2.2
(DIR3rc/JH4)

DATE OF DEATH -----

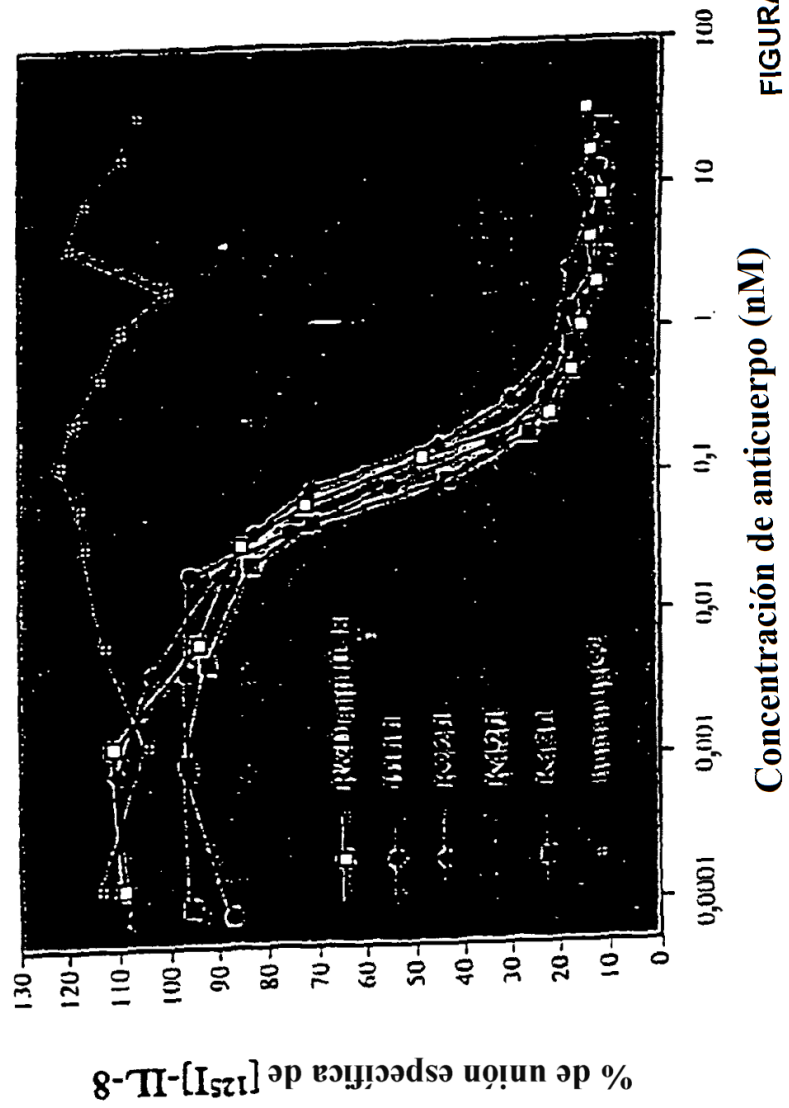
76

Secuencias de la cadena kappa de anticuerpos anti-IL-8

Ck humana					
Vk (J _k)		CDR1	CDR2	CDR3	
08		TITCQASQDISNYLNWYQQKPKAPKLLIYDASNLETCVPSPRFSQSGSGTDFTTISLQPEDIAITYYCQDNLP			RTVAAPSVTIFPPSSDEQ
D1.1 (Jk3)		-----KP-S-P-----	UT-Y-----S-----	V-----L-----	-----D--YTPQPTKVDIK-----
K4.2 (Jk4)		A-----V-----A-----	A-----A-----	-----H-----	-----LTPGQOTKVEIK-----
02		CDR1	CDR2	CDR3	
		TCRASQSISSVLYNQKPKAPKLIYAASSLQSGVPSRFSQSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYSTP			
K4.3 (Jk4)		-----N-----	P-G-----E-----	-----N-----	-----LTPGQOTKVEIK-----
B3		CDR1	CDR2	CDR3	
		TINCKSSQSVLYBSNNKNTLAWYQQKPPKLLIYNASTRSQTVDNFSQSGSGTDFTLTISLQAEQVAVYYCQYVSTP			
K2.2 (Jk3)		-----I-----	S-----K-----	-----D-----	-----FTTPQPTKVDIK-----

FIGURA 21

Los anticuerpos anti-IL-8 humana bloquean la unión de IL-8 a neutrófilos humanos



Inhibición de la expresión de CD11b en neutrófilos humanos por anticuerpos anti-IL-8

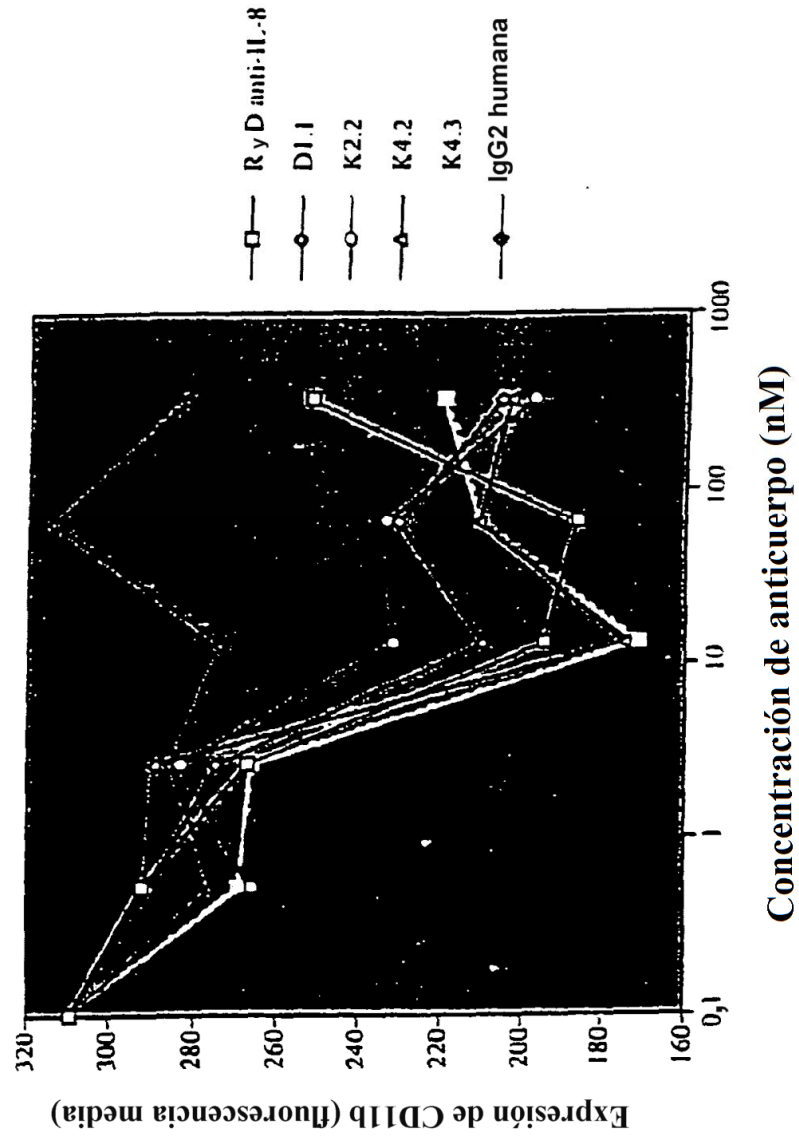


FIGURA 23

Inhibición del flujo de entrada del Ca^{+2} inducido por IL-8 por anticuerpos anti-IL-8

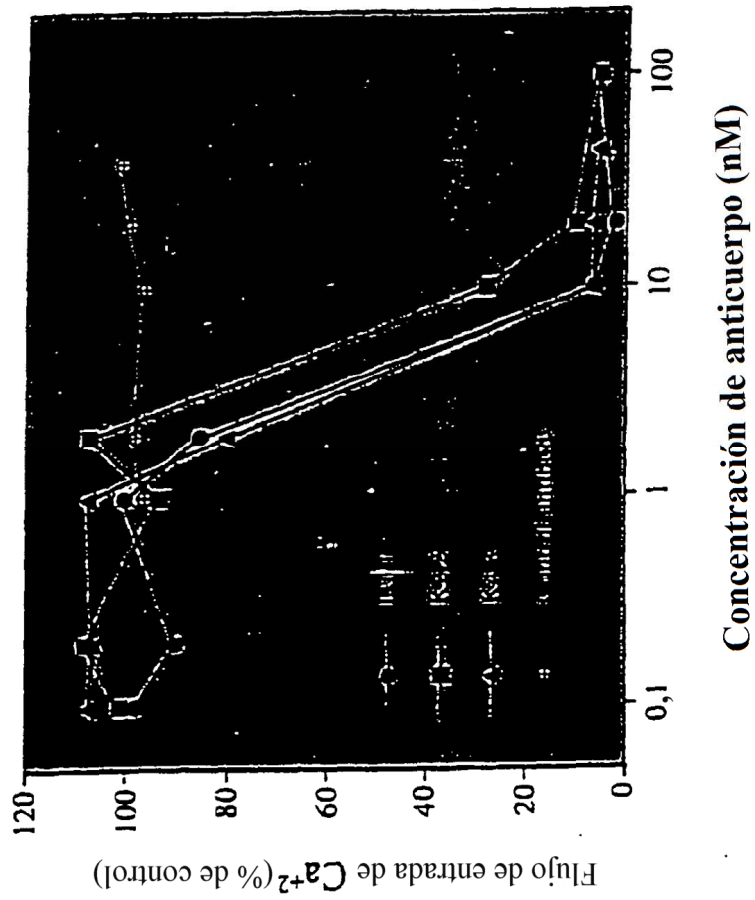


FIGURA 24

Inhibición de la quimiotaxis de RB/293 por IL-8

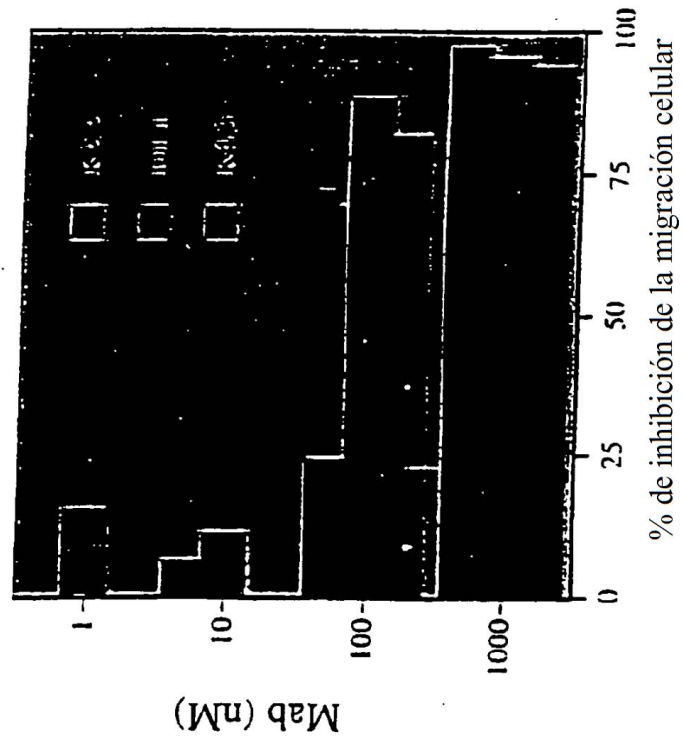
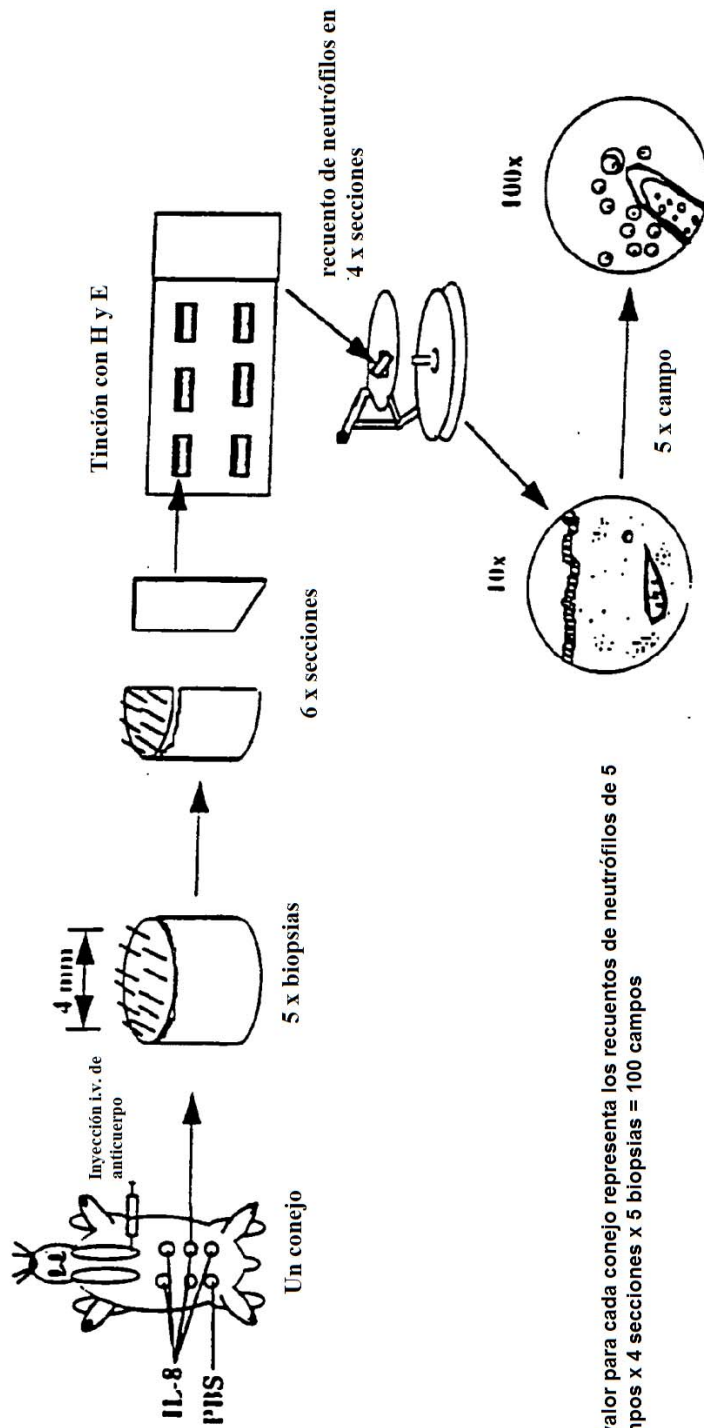


FIGURA 25

Wang y Oppenheim, NCI

Modelo de conejo de inflamación de la piel inducida por IL-8 humana



El valor para cada conejo representa los recuentos de neutrófilos de 5 campos x 4 secciones x 5 biopsias = 100 campos

FIGURA 26

Inhibición en conejos de inflamación de la piel inducida por IL-8 por anticuerpos Anti-IL-8

Los anticuerpos se administraron en una sola dosis i.v. a 4 mg/kg

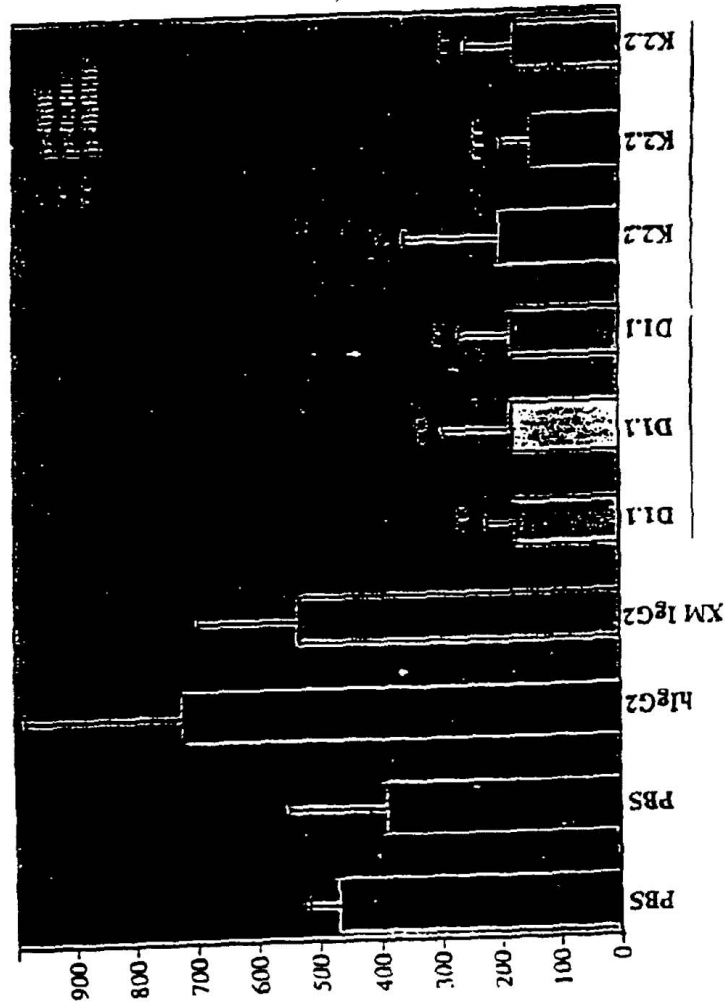


FIGURA 27

mAb humanos de control

**Inhibición de angiogénesis en un
modelo del bósillo corneal en ratas**

<u>Implante</u>	<u>Angiogénesis (n° de córneas)</u>	
	<u>Positivas</u>	<u>Negativas</u>
IL-8 sola	15	1
IL-8 + MAb de control	4	1
IL-8 + D1.1	0	6
IL-8 + K2.2	1	5
IL-8 + K4.3	2	4

FIGURA 28

Composición génica de anticuerpos contra EGFR

Anticuerpo	VH	D	JH	Vκ	Jκ
E1.1	4 - 31	2	JH5	018	Jκ4
E2.4	4 - 31	A1/A4	JH3	018	Jκ4
E2.5	4 - 31	XP1/21-10	JH4	018	Jκ4
E2.11	4 - 61	XP1/21-10	JH4	018	Jκ2

FIGURA 29

Secuencias de la cadena pesada de anticuerpos contra EGFR

$\gamma 2$ humana					
$V_H(D_H/J_H)$					ASTKQPSVTPFLAPCSN8TST
4-31	CDR1	CDR2	CDR3		
E1.1 (D2/JH ₃)	VSCQSISSGCTTNSWIRQPFCKOLEMIGYIYYSSQSTYTHPSLKSRVTISVDTSEKQPSLKISSVTAADTAVYICAR			STVNPQMTDP	MQQGYLVTVSS
E2.4 (DA1/A4/JH ₃)	N-D	9-N-F	C	NIVTQAFTDI	MQQGTMTVTVSS
E2.5 (DHP1/D21-10/JH ₄)	D-T	N-SM-I-E		KPTVCGEDYH	QQGTLLVTVSS
4-61	CDR1	CDR2	CDR3		
E2.11 (DHP1/D21-10/JH ₄)	VSCQSVSSQSTYTHSWIRQPFCKOLEMIGYIYYGCTHTHPSLKSRVTISVDTSEKQPSLKISSVTAADTAVYICAR			DPLTQSP	PDY
	D	HL	L		MQQGTLLVTVSS

FIGURA 30

Bloqueo de la unión del EGF a células A431 por anticuerpos anti-EGFR

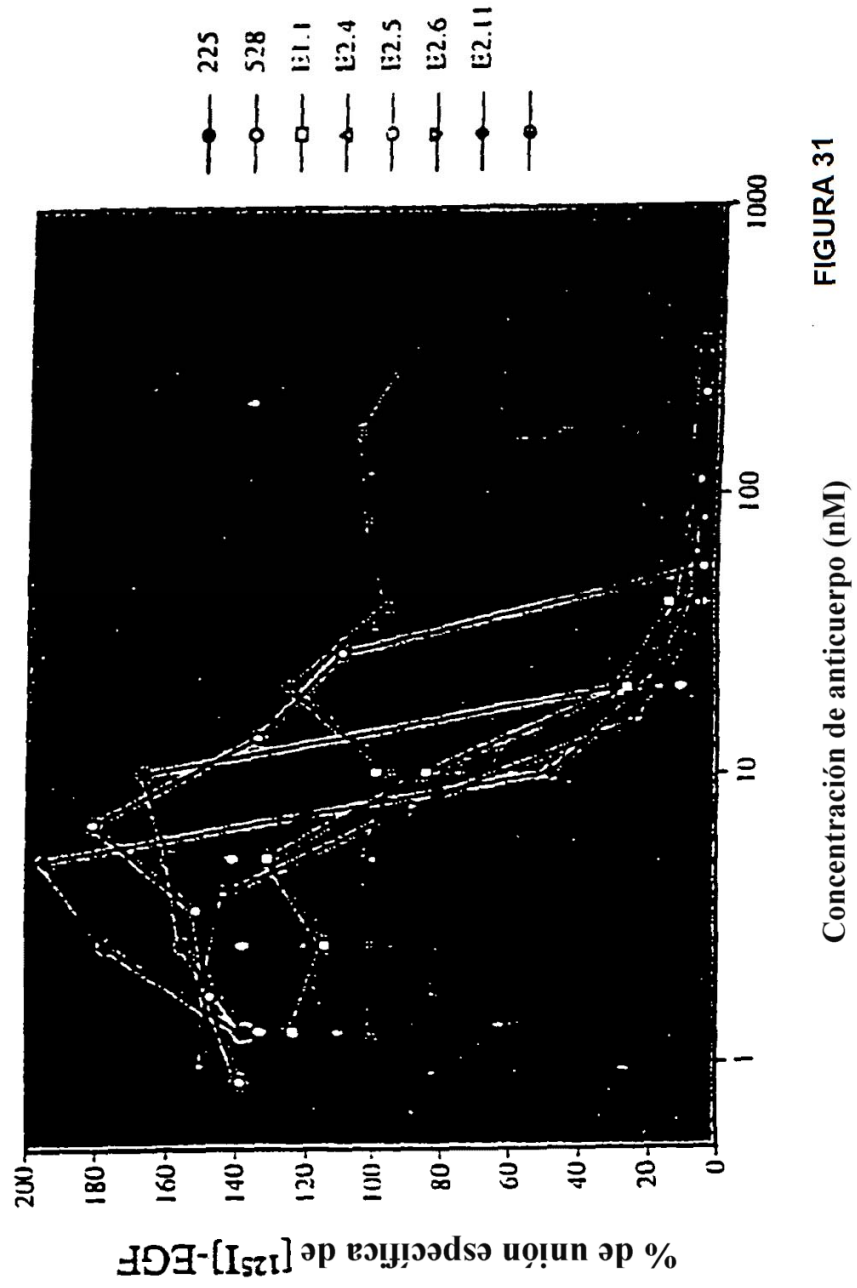


FIGURA 31

Inhibición de la unión del EGF a células SW948 por anticuerpos humanos anti-EGFR

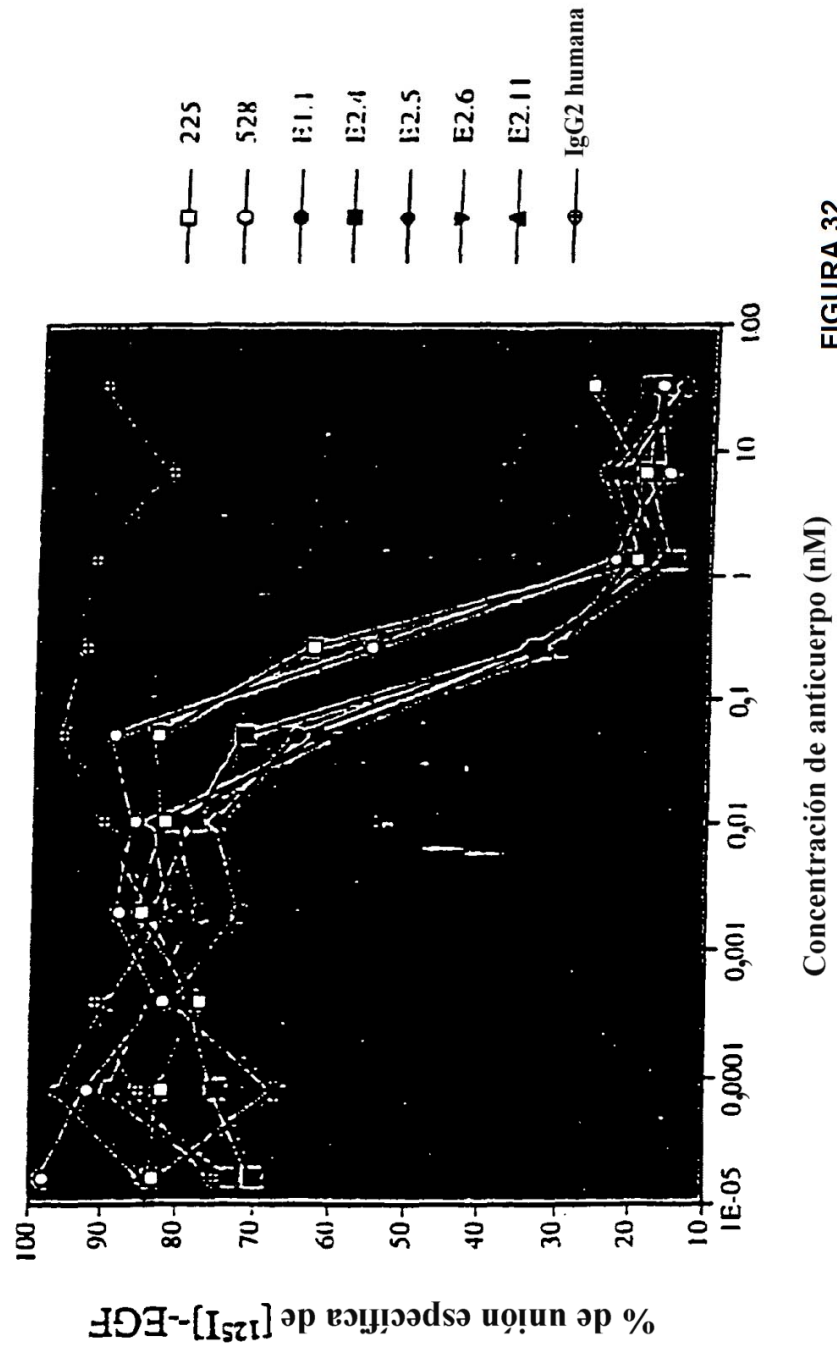


FIGURA 32

Los anticuerpos humanos anti-EGFR inhiben el crecimiento de células SW948

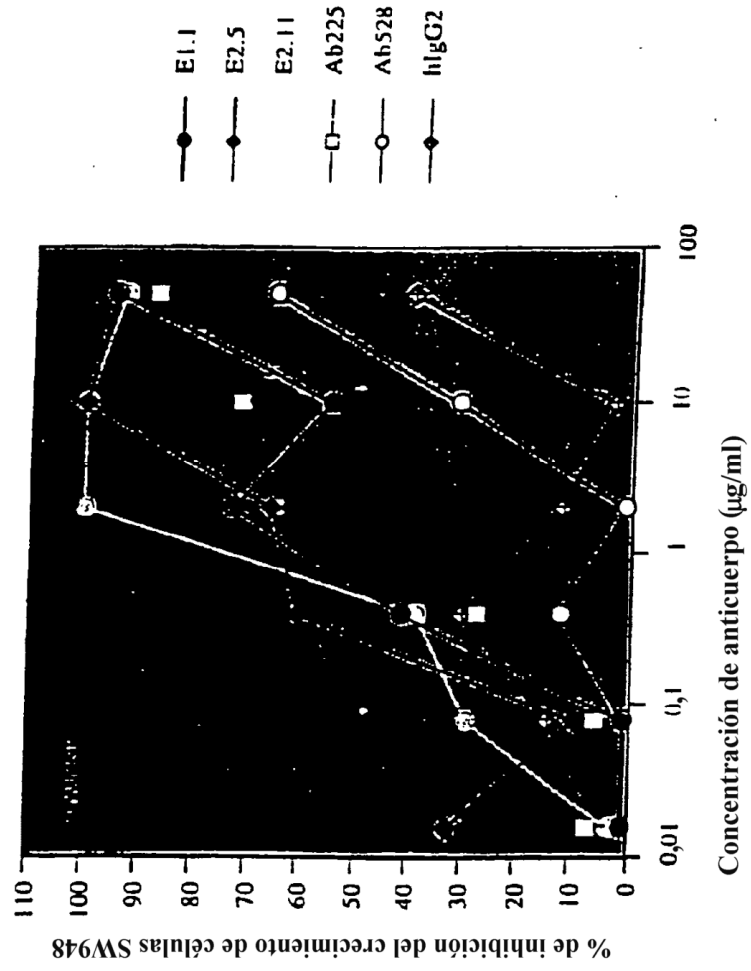


FIGURA 33

Inhibición de la unión a TNF- α a células U937 por anticuerpos monoclonales humanos anti-TNF- α

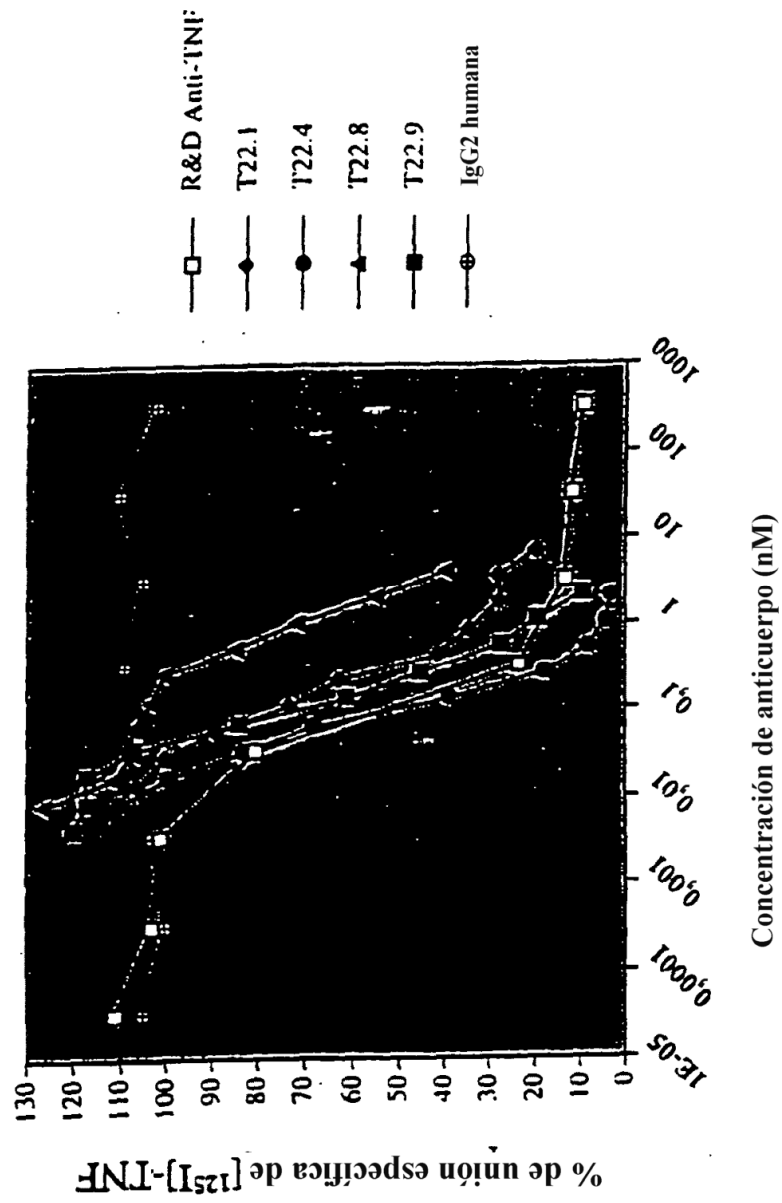


FIGURA 34

Secuencias de la cadena ligera kappaVk(J_k)
de anticuerpos anti-EGFR

E1.1
TITCQASQDINNYLNWFQQKPGKAPKVLIHDA
SNLETGGPSRFSGSGSGTDFTFTISGLQPEDIA
TYCQQESLPLTFGGGKVEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQ;

E2.4
TITCQASQDITIYLNWYQQKPGKAPKLLINDAS
SLETGVPLRFSGSGSGTDFTFTISSLPQEDIA
TYCQQDHLPLTFGGGKVAIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQ;

E2.5
TITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDAS
NLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPQEDV
GTYVYVQQESLPCGFGQGTKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQ;

E2.11
TITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLINDAS
DLETGVPSRISGSGSGTDFTFTISNLPQEDIA
TYCQQDSLPLTFGGGKVEIRRTV
AAPSVFIFPPSDEQ;

FIGURA 35