

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 811**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2009 E 09713778 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015 EP 2242847**

54 Título: **Ratones transgénicos del gen cgamma de las inmunoglobulinas humanas de clase G**

30 Prioridad:

22.01.2008 FR 0800319

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

28.01.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE LIMOGES (50.0%)
33 Rue François Mitterrand
87032 Limoges, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**COGNE, MICHEL;
DUCHEZ, SOPHIE;
COGNE, NADINE y
PINAUD, ERIC**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 557 811 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ratones transgénicos del gen cgamma de las inmunoglobulinas humanas de clase G.

5 La presente invención se refiere a un ratón transgénico de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulinas humanas de clase G y a sus aplicaciones para la producción de anticuerpos humanizados de clase IgG, en particular de IgG1 humanizadas.

10 Las inmunoglobulinas o anticuerpos son moléculas bifuncionales capaces de ligarse a un gran número de antígenos por sus dominios variables (VH y VL) y de interactuar por sus dominios constantes con células del sistema inmunitario (monocitos, macrófagos) y sistemas efectores del organismo (sistema del complemento, CDDA, opsonización). La estructura de las inmunoglobulinas comprende dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas conectadas por puentes disulfuro. Existen 5 clases principales de inmunoglobulinas o anticuerpos (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) así como subclases o isotipos (por ejemplo, de IgG1 a IgG4 en el hombre) determinados por su tipo de cadena pesada. La clase de las IgG, en particular la subclase de IgG1 en el hombre, corresponde a los anticuerpos más activos.

15 Efectivamente, las inmunoglobulinas G (IgG) constituyen la parte esencial de la respuesta secundaria a los antígenos. El enlace de IgG con el antígeno tiene un efecto directo de neutralización (toxinas, virus). La mayoría de las subclases de IgG, y especialmente la IgG1 en el hombre, son capaces de activar la cascada enzimática del complemento que desemboca en la lisis de las células diana. Las IgG son los anticuerpos más eficaces para sensibilizar las dianas de reacciones de citotoxicidad dependiente de anticuerpo (CCDA o ADCC por *Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity*). Los macrófagos y los neutrófilos poseen receptores de $\text{Fc}\gamma$ ($\text{RFc}\gamma$) que participan en la captura de los complejos inmunitarios (fenómeno de opsonización). Además, las IgG cruzan la barrera placentaria (en el hombre).

20 Las IgG comprenden dos cadenas pesadas idénticas (cadena γ) de isotipo $\gamma 1$ a $\gamma 4$ (subclase IgG1 a IgG4) en el hombre, asociadas a través de puentes disulfuro con dos cadenas ligeras idénticas de isotipo kappa (κ) o lambda (λ).

25 La cadena pesada γ , que es específica de esta clase de inmunoglobulinas, existe en forma membranal y en forma secretada. La forma secretada comprende cuatro dominios de aproximadamente 110 aminoácidos: un dominio variable VH y tres dominios constantes CH1, CH2 y CH3, así como una región bisagra ("hinge" o H) entre CH1 y CH2. La forma membranal comprende además un dominio hidrófobo (m1) que permite el anclaje de la proteína en la membrana, así como un dominio intracitoplasmático (m2). La región de la cadena pesada correspondiente a los dominios CH1, CH2, H, CH3 (forma secretada) o CH1, CH2, H, CH3, m1, m2 (forma membranal) se denomina región constante en contraste con la región correspondiente al dominio variable VH, que se denomina región variable.

30 Las cadenas ligeras κ y λ , que son comunes al conjunto de las clases y subclases de inmunoglobulinas, comprenden dos dominios: un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). En el hombre, la expresión de las cadenas κ y λ es equivalente, mientras que en el ratón la expresión del locus λ es muy baja, de tal modo que un 95 % de las cadenas ligeras son de tipo κ . La región de la cadena ligera correspondiente al dominio CL se denomina región constante en contraste con la región correspondiente al dominio variable VL, que se denomina región variable.

40 Los genes de inmunoglobulinas se organizan en loci, un locus para las cadenas pesadas (locus de IgH) y un locus para cada una de las cadenas ligeras (locus lambda y kappa).

Los loci de las cadenas ligeras comprenden cada uno de los genes V y J codificantes del dominio variable y los genes C que codifican el dominio constante; en el transcurso de la diferenciación de los linfocitos B, se reordena un gen V con un gen J y un gen C, y la región V experimenta además mutaciones somáticas que permiten producir anticuerpos de alta afinidad por el antígeno.

45 El locus de las cadenas pesadas comprende los genes V, D y J codificantes del dominio variable y los genes C ($C\mu$, $C\delta$, $C\gamma$, $C\epsilon$ y $C\alpha$) codificantes de los dominios constantes de los isotipos de diferentes clases de inmunoglobulinas; cada gen C, excepto $C\delta$, está precedido por una secuencia de conmutación o "switch" (S). Los genes $C\gamma$ ($C\gamma 1$ a $C\gamma 4$ en el hombre) contienen intrones que separan los exones codificantes de los dominios constantes CH1, H, CH2, CH3 y los exones de membrana m1 y m2.

50 En el transcurso de la diferenciación de los linfocitos B, se reordena un gen V con un gen D y un gen J, y la región V experimenta igualmente mutaciones somáticas que permiten producir anticuerpos de alta afinidad por el antígeno. Además, aunque la respuesta primaria al antígeno está constituida principalmente por IgM, la respuesta secundaria está asociada al mecanismo de conmutación de clase en el transcurso del cual la secuencia de conmutación $S\mu$, situada en dirección 5' de $C\mu$, se recombina con otra secuencia de conmutación conduciendo así a la producción de otra clase de inmunoglobulina (IgG, IgE u IgA).

55

La diversidad de anticuerpos producidos en respuesta a la estimulación por un antígeno proviene de la combinación de varios mecanismos: la multiplicidad de los genes V, la mutación somática de estos genes V, la recombinación somática de los genes V y la recombinación somática de las secuencias de conmutación.

5 Debido a su capacidad de enlace con antígenos, que es extremadamente específica, y a sus propiedades efectoras (neutralizantes, citotóxicas), los anticuerpos monoclonales, y en particular aquellos de la clase de IgG, poseen un vasto campo de aplicaciones en numerosos sectores, especialmente médico, para el diagnóstico y el tratamiento de patologías (patologías infecciosas, tumorales, alergias, rechazos de injerto, intoxicaciones...).

10 Sin embargo, el uso *in vivo* en el hombre de anticuerpos monoclonales con fines de diagnóstico (imagenología) o terapéutico está limitado debido a que la mayoría de los anticuerpos utilizables son anticuerpos xenogénicos (anticuerpos de ratón) que son mal tolerados y poco eficaces en el hombre y porque no existe un método que permita obtener anticuerpos recombinantes humanos o humanizados que sean de entrada mayoritariamente de clase IgG, que es la más activa.

15 Efectivamente, el uso de anticuerpos de ratón en inmunoterapia humana conduce a menudo a la aparición de anticuerpos humanos anti-anticuerpos de ratón, fenómeno que puede acompañarse de reacciones de hipersensibilidad y de la aparición de índices elevados de complejos inmunitarios además de las capacidades bloqueantes de estos anticuerpos frente al anticuerpo monoclonal. Además, las propiedades eficaces de los anticuerpos: fijación a C1q, primera etapa de activación de la vía clásica del complemento que desemboca en la lisis de células diana o en RfC, responsables de la captura de complejos inmunitarios o de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (CCDA), no son óptimas para los anticuerpos de ratón inyectados en el hombre.

20 Los problemas observados con los anticuerpos monoclonales de ratón se resuelven mediante el uso de anticuerpos humanizados, y en particular de IgG humanizadas, de estructura muy cercana a los anticuerpos humanos y por ello mejor tolerados y más eficaces. Se llama anticuerpo humanizado a un anticuerpo derivado de un mamífero no humano mediante la fusión de los dominios constantes de cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo humano con los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo de un mamífero no humano.

25 Sin embargo, los métodos de producción de anticuerpos recombinantes humanos o humanizados de clase IgG actualmente disponibles son poco eficaces y presentan los inconvenientes siguientes:

- * la inmortalización de linfocitos B humanos específicos de un antígeno es poco eficaz.
- * Los métodos *in vitro* se basan en la producción de anticuerpos animales, seguida de la clonación de los genes codificantes de sus regiones variables, su asociación por ingeniería genética con genes correspondiente a las regiones constantes de anticuerpos humanos y después la expresión *in vitro* en células CHO transfectadas. Estos métodos no permiten predecir la actividad potencial de los anticuerpos humanos en el hombre debido a su estructura, que es diferente de la de los anticuerpos humanos, y a su baja capacidad de agrupar células efectoras humanas. A causa de este problema, es solo después de un largo trabajo de inmunización *in vitro* que puede validarse dicho anticuerpo; las etapas de clonación y construcción de los genes quiméricos son largas y sometidas a riesgos; la expresión *in vitro* en células CHO transfectadas tiene un rendimiento poco elevado.

- * Los métodos *in vivo* se basan en la producción de inmunoglobulinas monoclonales humanas directamente en ratones transgénicos en los que todos o parte de los loci de los genes de inmunoglobulinas de ratón están reemplazados por todos o parte de los loci equivalentes humanos: XenoMouse® de Abgenix (patentes US 6.114.598, 6.162.963, 6.150.584, 6.673.986, 6.395.514 y EP 1690935; solicitudes US 2005/287630 y 2005/241006), HuMAb-Mouse® de Medarex (solicitud US 2003/14483 y patente CA 2508763), patente US 5.545.807; TC Mouse™ de Kirin Brewery (solicitud US 2002/0199213) y KM-Mouse® de Medarex y Kirin Brewery.

45 Inicialmente, se han creado dos tipos de ratones transgénicos que permiten obtener por cruzamiento ratones productores de anticuerpos humanos funcionales (Lonberg *et al.*, Nature, 1994, 368: 856-859, Green *et al.*, Nat. Genet., 1994, 7, 13-21). Unos tenían integrado un fragmento de 80 kb reconstruido artificialmente correspondiente a diversas partes del locus de cadenas pesadas humanas (o sea 4 genes VH, 15 segmentos D, 6 segmentos J, las secuencias codificantes de las regiones Fc μ y Fc γ 1 así como aquellas necesarias para la conmutación); otros tenían integrado un fragmento de 43 kb que contenía 4 genes V κ , 5 segmentos J κ , el gen C κ y las secuencias potenciadoras adecuadas. Estas estirpes de ratones transgénicos son generalmente deficientes de producción de inmunoglobulinas de murido, en particular debido a la invalidación del locus kappa endógeno (ratón κ -/-) y/o a una mutación que inactiva el locus de IgH endógeno (mutación μ MT -/-). Los ratones obtenidos por cruzamiento producían anticuerpos humanos de tipo IgM o IgG en sus respuestas secundarias, indicando que los fragmentos introducidos permiten la conmutación de clase; además, el análisis de los anticuerpos monoclonales obtenidos 50 mostró que las mutaciones somáticas afectaban a regiones variables de estos anticuerpos en la respuesta secundaria, indicando la existencia de una maduración aparentemente correcta de la respuesta de anticuerpo.

Se han obtenido igualmente otras estirpes de ratones que comprenden los genes $C\mu$, $C\delta$ y uno de los genes $C\gamma 1$, $C\gamma 2$, $C\gamma 3$ o $C\gamma 4$ humanos [IgG1, IgG2 e IgG4: XenoMouse® de Abgenix (Green *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 1999, 231, 11-23; solicitud internacional PCT WO 00/76310 y solicitud estadounidense US 2006/0134780); IgG1 e IgG3: HuMab Mouse® de GenPharm-Medarex] o el locus de la cadena ligera lambda (solicitud US 2002/0088016)).

5 Otro enfoque consistente en introducir fragmentos cromosómicos humanos enteros (tecnología “transcromosómica”) ha permitido generar ratones que contienen un 100 % de genes humanos (TC Mouse™ de Kirin Brewery; Tomizuka *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000; 97, 722-727). Se han establecido a continuación estirpes de ratones híbridos (KM-Mouse®: HuMab-Mouse® x TC Mouse®) y presentarían la ventaja de desarrollar respuestas inmunitarias mucho más elevadas que las observadas con los ratones HuMab-Mouse®.

10 Estos métodos *in vivo* no permiten orientar la producción de inmunoglobulinas humanas hacia la clase IgG. Los modelos de ratones transgénicos para cóntigos del locus de cadenas pesadas humanas que incluyen varios genes variables y los genes $C\mu$ y $C\gamma$ que codifican las regiones constantes de los anticuerpos humanos IgM e IgG tienen un repertorio de baja diversidad debido a la inclusión parcial del locus dentro del cóntigo, con un número limitado de genes V, y por ello las dificultades para obtener anticuerpos de alta afinidad y obtener IgG en animales que producen sobre todo IgM humanas.

15 Por otro lado, la solicitud internacional PCT WO 2005/04733 describe una estirpe de ratones transgénicos productora de altas cantidades de inmunoglobulinas humanizadas de clase IgA (del orden del gramo por litro). En esta estirpe, el gen $C\alpha 1$ que codifica la cadena pesada de inmunoglobulina $\alpha 1$ humana se ha insertado en el locus de IgH en lugar de la secuencia de conmutación $S\mu$ (mutación alfa1 de modificación génica o alfa1-KI). En esta
20 construcción, la supresión de la secuencia de conmutación $S\mu$ asociada a la inserción del transgén $C\alpha$ en lugar de esta secuencia anula la expresión del gen μ endógeno responsable de la síntesis de cadenas pesadas de IgM. Además, disminuye en gran medida la de otros genes de cadenas pesadas de inmunoglobulinas (IgG, IgE) debido al bloqueo de la conmutación de clase hacia los genes constantes de inmunoglobulinas situados en dirección 3' de $C\mu$ en el locus de IgH endógeno. Así, los animales transgénicos obtenidos producen altas cantidades de IgA quiméricas cuyo dominio constante de la cadena pesada está humanizado y los dominios variables son de origen múdo.

25 Sin embargo, el estado actual del conocimiento no permite contemplar producir otras clases de inmunoglobulinas humanas mediante una estrategia análoga a la descrita para las IgA en la solicitud internacional PCT WO 2005/047333. Efectivamente, cada clase de inmunoglobulina (IgA, IgG, IgE, IgM) constituye un receptor diferente insertado en la membrana celular por un dominio de secuencia diferente. En consecuencia, la eficacia de las IgA humanas que permite la diferenciación B no permite deducir que sería igual para cualquier otra clase de inmunoglobulina humana. Además, el intento de expresión de IgE humanas en lugar de IgM de ratón, siguiendo una estrategia análoga a la usada para las IgA, ha dado como resultado la ausencia completa de linfocitos B en animales homocigóticos de la mutación. Además, no es conocida la diferenciación de linfocitos B mediante la expresión de una inmunoglobulina humana de clase G en el ratón.

30 En este contexto, los inventores han construido una estirpe de ratón en la que el gen $C\gamma 1$ que codifica la cadena pesada de inmunoglobulina $\gamma 1$ humana se ha insertado en el locus de IgH en lugar de la secuencia de conmutación $S\mu$ (mutación gamma1 de modificación génica, gamma1-KI o $\gamma 1$ -KI). Han mostrado que, de forma imprevisible, la obtención de mutantes homocigóticos de la inserción de $\gamma 1$ en el locus de IgH permitía obtener ratones productores de linfocitos B que expresan muy mayoritariamente la cadena pesada $\gamma 1$ humana y a un índice muy reducido (100 veces inferior al normal) las cadenas pesadas de múdo. Esta estirpe denominada “Gammaprim” se ha caracterizado como capaz de producir IgG1 humanizadas al nivel de la cadena pesada y capaz de producir anticuerpos monoclonales humanizados de clase IgG1 con fines de inmunoterapia (antiinfecciosa o antitumoral) o de diagnóstico. Esta estirpe puede usarse igualmente para el cribado rápido de anticuerpos monoclonales que tienen las propiedades efectoras de una IgG1 humana en pruebas de actividad *in vitro* o *in vivo*.

35 Como consecuencia, la invención tiene como objeto un ratón transgénico caracterizado por que comprende un locus de IgH modificado por reemplazo de la secuencia de conmutación $S\mu$ por todo o parte de un transgén constituido por el gen $C\gamma$ de una inmunoglobulina humana de clase G, incluyendo al menos el exón codificante del dominio CH3 y los exones de membrana m1 y m2, y por que produce anticuerpos que son mayoritariamente IgG quiméricas en las que los dominios constantes de las cadenas pesadas son de origen humano.

40 De acuerdo con la invención, el transgén $C\gamma$, o la parte de este transgén que incluye al menos el exón codificante del dominio CH3 y los exones de membrana m1 y m2, que se inserta en lugar de la secuencia de conmutación $S\mu$, está situado por ello entre el activador intrónico $E\mu$ en dirección 5' y el gen $C\mu$ en dirección 3' (Figura 1).

45 En esta construcción, la supresión de la secuencia de conmutación $S\mu$ asociada a la inserción del transgén $C\gamma$ en lugar de esta secuencia anula la expresión del gen μ endógeno responsable de la síntesis de las cadenas pesadas de IgM. Además, se reduce igualmente en gran medida la de otros genes de cadenas pesadas de inmunoglobulinas debido al bloqueo de la conmutación de clase hacia los genes constantes de inmunoglobulinas situados en dirección 3' de $C\mu$ en el locus de IgH endógeno. Así, los ratones transgénicos obtenidos producen altas cantidades de IgG

quiméricas cuyo dominio constante de la cadena pesada está humanizado y los dominios variables son de origen múrdo.

5 La cadena pesada transgénica γ humana se beneficia de un repertorio totalmente diversificado ya que es el correspondiente al repertorio normal generado por las reordenaciones de los segmentos VH, D y JH del locus de IgH de múrdo. Además, los ratones transgénicos son capaces de producir anticuerpos humanizados de alta afinidad en la respuesta secundaria al antígeno, debido a que sus linfocitos B pueden agrupar el fenómeno de hipermutación somática. Da como resultado la obtención directa de anticuerpos monoclonales por inmunización de los ratones y derivación de hibridomas, sin necesidad de clonación de los genes de inmunoglobulinas. La actividad efectora (citotóxica, neutralizante) de los anticuerpos monoclonales así obtenidos puede validarse inmediatamente, y estos anticuerpos monoclonales pueden progresar rápidamente hacia el estado de ensayos clínicos o de un uso como reactivo de diagnóstico. Los ratones transgénicos según la invención constituyen por tanto una herramienta preciosa para la producción directa, el cribado y la validación funcional de anticuerpos monoclonales de intención terapéutica o de diagnóstico.

15 Según un modo de realización ventajoso de la invención, dicho ratón transgénico es homocigótico de dicho locus de IgH modificado.

Según otro modo de realización ventajoso de la invención, dicho locus de IgH está modificado por el reemplazo de la secuencia de conmutación $S\mu$ por la totalidad del gen $C\gamma$, incluyendo los exones CH1, bisagra (H o "hinge"), CH2, CH3 y los exones de membrana (m1 y m2), separados por los intrones correspondientes.

20 Según otro modo de realización ventajoso de la invención, se modifica dicho locus de IgH por el reemplazo de la secuencia de conmutación $S\mu$ por el segmento del gen $C\gamma$ que incluye el exón codificante del dominio CH3 y los exones de membrana m1 y m2, separados por los intrones correspondientes.

Según otro modo de realización ventajoso de la invención, dicho gen $C\gamma$ es el gen $C\gamma 1$.

Según aún otro modo de realización ventajoso de la invención, dicho ratón transgénico comprende otro transgén que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina humana.

25 Según una disposición ventajosa de este modo de realización, dicho transgén es un gen kappa humano (que codifica una cadena ligera kappa humana).

30 Preferiblemente, dicho transgén es un gen kappa humano que comprende el activador intrónico $E\mu$ en dirección 5' y el palíndromo *hs3a/hs1,2/hs3b* en dirección 3'. Estas secuencias, que se describen en Chauveau *et al.*, Gene, 1998, 222, 279-285, permiten obtener una alta expresión de la cadena kappa humana en linfocitos B e inducir la hipermutación somática del transgén kappa humano. Preferiblemente, dicho transgén está bajo el control del promotor de la cadena pesada humana (pVH).

Según una disposición ventajosa de este modo de realización, dicho gen kappa humano presenta la secuencia SEQ ID NO: 9.

35 Según otra disposición ventajosa de este modo de realización, dicho mamífero no humano transgénico es homocigótico o heterocigótico de dicho transgén.

40 Según una disposición ventajosa de los modos de realización precedentes de la invención, dichos ratones transgénicos que comprenden otro transgén que codifica una cadena ligera kappa humana poseen un locus endógeno de la cadena ligera kappa de inmunoglobulinas inactivado (eliminado o mutado), especialmente por recombinación homóloga. Preferiblemente, dichos ratones transgénicos son homocigóticos de dicha inactivación. Entre los ratones transgénicos cuyo locus endógeno de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina se ha inactivado por recombinación homóloga, se pueden citar especialmente la estirpe de ratones descrita en Zou *et al.*, EMBO J., 1993, 12, 811-820 y la mutación κD descrita en Sirac *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103, 7747-7752.

Dichos ratones transgénicos producen IgG humanizadas de las que la casi totalidad de las cadenas ligeras son de origen humano.

45 La invención engloba especialmente una estirpe de ratones transgénicos denominada línea "Gammaprim" que comprende:

- un locus de IgH modificado por el reemplazo de la secuencia de conmutación $S\mu$ por el gen $C\gamma 1$ de una inmunoglobulina humana de clase G.

50 La invención engloba igualmente una estirpe de ratón doble transgénico denominada Gammaprim-kappa, que comprende:

- un locus de IgH modificado por el reemplazo de la secuencia de conmutación $S\mu$ por el gen $C\gamma 1$ de una inmunoglobulina humana de clase G, y

- un gen V_{κ} humano completo que comprende el gen $V_{\kappa 1}$ reordenado con un gen $J_{\kappa 5}$, el intrón $J_{\kappa}-C_{\kappa}$ y el gen C_{κ} bajo el control transcripcional del promotor de la cadena pesada humana (p_{VH}), del activador intrónico E_{μ} en dirección 5' y del palíndromo $hs3a/hs1,2/hs3b$ en dirección 3'.

5 Los animales de esta estirpe doble transgénica producen IgG1 parcialmente humanizadas por la cadena pesada y totalmente humanizadas por lo referente a la cadena ligera.

Efectivamente, la expresión de la cadena kappa transgénica en esta estirpe es capaz de conllevar la exclusión alélica, es decir, de impedir en la mayoría de los linfocitos B transgénicos la expresión de los genes endógenos de cadenas ligeras de inmunoglobulinas de murido.

10 El repertorio de respuesta a los antígenos de esta estirpe de ratón es normal, dado que es esencialmente el dominio VH de la cadena pesada el que contribuye a la formación del sitio de anticuerpo. Así pues, la cadena pesada transgénica γ humana se beneficia de un repertorio totalmente diversificado, ya que corresponde al repertorio normal generado por las reordenaciones de los segmentos VH, D y JH del locus de IgH de murido, como se precisa anteriormente.

15 Además, los ratones de esta estirpe transgénica son capaces de producir anticuerpos de alta afinidad en respuesta secundaria al antígeno, debido a que sus linfocitos B pueden agrupar el fenómeno de hipermutación somática, a la vez al nivel del gen de la cadena pesada y del transgén de la cadena ligera kappa.

20 Los ratones transgénicos según la invención se obtienen mediante procedimientos clásicos de transgénesis animal, según protocolos estándares tales como los descritos en "Transgenic Mouse: Methods and Protocols; Methods in Molecular Biology", Clifton, N.J., volumen 209, octubre de 2002. Editado por: Marten H Hofker, Jan Van Deursen, Martern H Hofker y Jan Van Deursen. Publicado por Holly T Sklar: Humana Press.

25 Las secuencias de los genes humanos y de murido de inmunoglobulinas que sirven para la construcción de ratones transgénicos según la invención son conocidas y accesibles en las bases de datos; pueden amplificarse por PCR con la ayuda de cebadores apropiados. Por ejemplo, la totalidad del gen $C_{\gamma 1}$ (SEQ ID NO: 13), incluyendo las secuencias del exón CH1, la región de bisagra ("hinge"), los exones CH2, CH3 y los exones de membrana m1 y m2 separados por los intrones correspondientes, puede amplificarse por PCR con la ayuda del par de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 8.

30 La construcción del gen V_{κ} humano es tal como se describe en Chauveau *et al.*, Gene, 1998, 222, 279-285; presentando la secuencia del gen $V_{\kappa 1}$, reordenada con el gen $J_{\kappa 5}$ y el gen C_{κ} correspondiente a la secuencia de GenBank X64133 (SEQ ID NO: 9) que codifica una cadena ligera humana, la secuencia correspondiente al número de acceso CAA45494 (SEQ ID NO: 10) en la base de datos EMBL.

35 Las inserciones de fragmentos génicos en el genoma de ratones pueden realizarse de forma aleatoria, preferiblemente se realizan de forma orientada, mediante recombinación homóloga con un vector de orientación apropiado que comprende eventualmente secuencias de recombinación de una recombinasa específica de sitio como los sitios LoxP de recombinasa Cre. Las inactivaciones o deleciones de fragmentos génicos en el genoma de ratones se realizan mediante recombinación homóloga con un vector de orientación apropiado que comprende eventualmente secuencias de recombinación de una recombinasa específica de sitio como los sitios LoxP de la recombinasa Cre. Los ratones dobles transgénicos se obtienen mediante cruzamiento de ratones transgénicos de la cadena pesada gamma con ratones transgénicos de la cadena ligera, tales como se definen anteriormente. La estirpe Gammaprim/kappa se obtiene mediante cruzamiento de ratones de la estirpe Gammaprim tal como se define anteriormente con ratones de la estirpe κ ARN que expresan una cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana tal como se describe en la solicitud internacional PCT WO 2005/047333.

Los ratones dobles transgénicos se cruzan eventualmente con ratones transgénicos cuyo locus endógeno de la cadena ligera kappa de inmunoglobulinas se ha inactivado por recombinación homóloga tales como se definen anteriormente.

45 La presente invención tiene igualmente como objeto un vector de orientación de la recombinación homóloga, caracterizado por que comprende el gen C_{γ} de una inmunoglobulina humana de clase G o un segmento de este gen que incluye al menos el exón codificante del dominio CH3 y los exones de membrana m1 y m2, flanqueado por fragmentos de secuencias del locus de IgH de murido que son adyacentes a la secuencia S_{μ} .

50 Según un modo de realización ventajoso de dicho vector de orientación, puede comprender un módulo de expresión de un marcador de selección apropiado, adyacente a dicho gen C_{γ} o al segmento de dicho gen tal como se define anteriormente.

Dicho módulo de expresión puede estar flanqueado por secuencias de recombinación específicas de sitio. Preferiblemente, dichas secuencias son las secuencias LoxP de la recombinasa Cre. Esta disposición permite eventualmente extraer dicho módulo de expresión.

55 Los fragmentos de secuencias que son adyacentes a la secuencia S_{μ} son de origen murido.

Según otro modo de realización de dicho vector de orientación, el gen $C\gamma$ o el segmento de dicho gen está flanqueado en 5' por un fragmento de aproximadamente 5 kb correspondiente a la región JH/E μ y un 3' por un fragmento de aproximadamente 5 kb correspondiente a la región C μ , correspondiendo dichos fragmentos respectivamente a las posiciones 131281 a 136441 y 140101 a 145032 de la secuencia de GenBank AC073553 (SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12).

La presente invención tiene igualmente como objeto células embrionarias de ratón modificadas por un vector de orientación tal como se define anteriormente.

Dichas células embrionarias (citoblastos totipotentes) modificadas son útiles para la obtención de ratones transgénicos tales como se definen anteriormente; se inyectan en blastocitos de ratón según las técnicas clásicas de transgénesis animal.

La presente divulgación tiene igualmente como objeto el uso de un mamífero no humano transgénico tal como se define anteriormente para la producción de anticuerpos humanizados de clase IgG o de fragmentos de estos anticuerpos.

La presente divulgación tiene igualmente como objeto un procedimiento de preparación de anticuerpos humanizados de clase IgG o de fragmentos de estos anticuerpos, caracterizado por que comprende al menos las etapas siguientes:

- la inmunización de un ratón transgénico tal como se define anteriormente con un antígeno de interés,
- la preparación, mediante cualquier medio apropiado, de anticuerpos humanizados de clase IgG o de fragmentos de estos anticuerpos a partir de suero, secreciones o linfocitos B de dicho ratón transgénico.

La presente divulgación tiene igualmente como objeto un procedimiento de cribado de anticuerpos terapéuticos, caracterizado por que comprende al menos las etapas siguientes:

- la inmunización de un ratón transgénico tal como se define anteriormente con un antígeno de interés,
- la preparación, mediante cualquier medio apropiado, de anticuerpos monoclonales dirigidos contra dicho antígeno de interés a partir de linfocitos B de dicho ratón transgénico,

- la evaluación de la actividad de dichos anticuerpos monoclonales mediante cualquier medio apropiado y
- la selección de los anticuerpos monoclonales activos.

La actividad de dichos anticuerpos monoclonales es especialmente la actividad de enlace específica del antígeno, la actividad neutralizante frente a un patógeno (virus, hongo, bacteria, parásito) o una toxina o bien la actividad citotóxica frente a células tumorales o células infectadas por un patógeno tal como se define anteriormente. Esta actividad se mide *in vitro* o *in vivo* mediante pruebas clásicas bien conocidas por el especialista en la materia.

Los ratones transgénicos según la invención presentan la ventaja de permitir la producción de anticuerpos monoclonales de clase IgG que son de entrada anticuerpos quiméricos humanizados de clase IgG. El procedimiento de producción de anticuerpos monoclonales humanizados de clase IgG según la invención es por tanto más sencillo, más rápido y más económico que los procedimientos de la técnica anterior, ya que no necesitan etapas adicionales de clonación de los genes de dichos anticuerpos ni de fusión de los dominios variables de dichos anticuerpos con los dominios constantes de inmunoglobulinas humanas. La actividad efectora (citotóxica, neutralizante) de los anticuerpos monoclonales así obtenidos puede validarse inmediatamente mediante pruebas de actividad *in vitro* o *in vivo*. Estos anticuerpos monoclonales pueden progresar rápidamente hacia el estado de ensayos clínicos o de un uso como reactivo de diagnóstico.

La divulgación engloba la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales constituidos por IgG o sus fragmentos, especialmente los fragmentos Fab, Fab'2 y Fc. Preferiblemente, dichos fragmentos son fragmentos funcionales que comprenden dominios variables de cadenas pesadas y ligeras (Fab, Fab'2, Fv, scFv).

Los anticuerpos humanizados de clase IgG tales como se definen anteriormente y sus fragmentos se preparan mediante las técnicas clásicas conocidas por el especialista en la materia, tales como las descritas en "Antibodies: A Laboratory Manual", E. Howell y D Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

De manera más precisa:

- Los anticuerpos policlonales se preparan mediante inmunización de un ratón transgénico tal como se define anteriormente con un antígeno de interés, eventualmente acoplado con KLH o albúmina y/o asociado con un coadyuvante apropiado tal como coadyuvante de Freund (completo o incompleto) o hidróxido de aluminio; después de la obtención de un título de anticuerpo satisfactorio, se recolectan los anticuerpos por extracción del suero de los ratones inmunizados y enriquecidos en IgG por precipitación según técnicas clásicas, y después se purifican eventualmente las IgG específicas mediante cromatografía de afinidad

sobre una colonia apropiada sobre la que se fija el antígeno tal como se define anteriormente, de forma que se obtenga una preparación de IgG monoespecíficas.

- 5 - Los anticuerpos monoclonales se producen a partir de hibridomas obtenidos mediante fusión de linfocitos B de un mamífero no humano transgénico tal como se define anteriormente con mielomas, según la técnica de Köhler y Milstein (*Nature*, 1975, 256, 495-497); se cultivan los hibridomas *in vitro*, especialmente en fermentadores, o se producen *in vivo* en forma de ascitis; como alternativa, dichos anticuerpos monoclonales se producen por ingeniería genética como se describe en la patente estadounidense US 4.816.567. Por ejemplo, los ratones transgénicos tales como se definen anteriormente se inmunizan fuerte y repetidamente con antígenos elegidos (antígenos de bacterias, virus, hongos, antígenos específicos de tumores tales como el antígeno carcinoembrionario, etc.) según un protocolo estándar que comprende una primera inmunización mediante inyección intraperitoneal del antígeno en un volumen equivalente de coadyuvante completo de Freund y después una segunda inmunización (recuerdo) 15 días más tarde en condiciones idénticas, pero esta vez con el coadyuvante incompleto de Freund. Los anticuerpos monoclonales se producen según un protocolo estándar que comprende el sacrificio de los ratones dos semanas después del último recuerdo, la extracción del bazo, la puesta en suspensión de los linfocitos esplénicos y la fusión de estos linfocitos con la estirpe celular SP2/0 (esta estirpe de múrido no produce ningún anticuerpo de múrido, está inmortalizada y posee toda la maquinaria de secreción necesaria para la secreción de inmunoglobulinas).
- 20 - Los fragmentos de anticuerpo se producen a partir de las regiones VH y VL clonadas a partir de ARNm de hibridomas o linfocitos esplénicos de un ratón transgénico según la invención inmunizado; por ejemplo, los fragmentos Fv o Fab se expresan en la superficie de fagos filamentosos según la técnica de Winter y Milstein (*Nature*, 1991, 349, 293-299); después de varias etapas de selección, se aíslan los fragmentos de anticuerpo específicos de antígeno y se expresan en un sistema de expresión apropiado mediante técnicas clásicas de clonación y expresión de ADN recombinante.

25 Los anticuerpos o sus fragmentos tales como se definen anteriormente se purifican mediante técnicas clásicas conocidas por el especialista en la materia, tales como la cromatografía de afinidad.

La presente invención tiene igualmente como objeto un anticuerpo humanizado de clase IgG susceptible de obtenerse mediante un procedimiento tal como se define anteriormente a partir de linfocitos B de un ratón transgénico, y caracterizado por que comprende cadenas pesadas quiméricas cuyos dominios constantes son de origen humano y los dominios variables proceden de dicho ratón, y cadenas ligeras humanas cuyos dominios variables están codificados por V κ 1-J κ 5.

La invención engloba los anticuerpos humanizados de clase IgG cuya cadena ligera está codificada por el gen V κ 1-J κ 5 que presentan la secuencia de Genbank X64133 (SEQ ID NO: 9) o una secuencia producida por hipermutación de esta secuencia, especialmente después de la activación de los linfocitos B en presencia del antígeno.

35 La invención engloba anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales así como sus fragmentos (Fab, Fc, Fab'2) susceptibles de obtenerse mediante el procedimiento tal como se define anteriormente, caracterizados por que comprenden un fragmento de dichas cadenas pesadas y ligeras tales como se definen anteriormente.

Los anticuerpos humanizados según la invención y sus fragmentos tales como se definen anteriormente son bien tolerados en el hombre (minimización del riesgo de reacción alérgica por inmunización interespecie) y poseen una semivida prolongada en el hombre, dado que la región constante de la cadena pesada y la totalidad de la cadena ligera de estos anticuerpos son de origen humano.

La presente divulgación tiene igualmente como objeto un anticuerpo humanizado de clase IgG o un fragmento de este anticuerpo, tales como se definen anteriormente, como medicamento; se usa dicho anticuerpo o su fragmento, que poseen propiedades efectoras (neutralizante, citotóxica) dirigidas contra un antígeno de interés, en inmunoterapia para la prevención y el tratamiento de patologías tales como especialmente enfermedades infecciosas, cánceres, intoxicaciones, alergias y rechazos de trasplante.

La presente invención tiene igualmente como objeto una composición farmacéutica, caracterizada por que comprende al menos un anticuerpo humanizado de clase IgG o un fragmento de este anticuerpo tal como se definen anteriormente, asociado mediante cualquier medio apropiado con una molécula terapéutica; el anticuerpo está dirigido preferiblemente contra un antígeno membranal, de forma que oriente el principio activo (toxina, agente antivírico, anticanceroso) a la célula diana.

Las composiciones pueden contener además al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable y eventualmente sustancias portadoras y/o coadyuvantes.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables, las sustancias portadoras y los coadyuvantes son aquellos usados clásicamente.

Los coadyuvantes se eligen ventajosamente del grupo constituido por emulsiones oleosas, saponina, sustancias minerales, extractos bacterianos, hidróxido de aluminio y escualeno.

Las sustancias portadoras se seleccionan ventajosamente del grupo constituido por liposomas unilamelares, liposomas multilamelares, micelas de saponina o microesferas sólidas de naturaleza sacarídica o aurífera.

- 5 Las composiciones según la invención se administran por vía intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intracraneal, oral, sublingual, intranasal, ocular, nasal, rectal, por inhalación o por aplicación transdérmica; la dosis y la cadencia de administración varían en función de la especie (humana o animal) y la enfermedad a tratar.

10 La presente invención tiene igualmente como objeto un reactivo de diagnóstico que comprende un anticuerpo humanizado de clase IgG o un fragmento de este anticuerpo tales como se definen anteriormente.

15 Los reactivos pueden estar acoplados con partículas o con un marcador apropiado. Las partículas son especialmente partículas de oro, liposomas (liposomas que contienen un colorante) o eritrocitos (inmunoaglutinación). El marcador es una sustancia que produce una señal detectable mediante métodos convencionales o que reacciona con otra sustancia de forma que produzca una señal detectable. Entre los marcadores utilizables en los métodos de diagnóstico según la invención, se pueden citar especialmente cromóforos, sustancias fluorescentes o quimioluminiscentes, enzimas, isótopos radiactivos y agentes complejantes (proteína A, proteína G, biotina, lectina).

20 Los reactivos tales como se definen anteriormente pueden inmovilizarse igualmente sobre un soporte apropiado según los métodos clásicos conocidos por el especialista en la materia. Entre los soportes apropiados sobre los que pueden inmovilizarse estos reactivos, pueden citarse especialmente aquellos de material plástico (látex, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), poliuretano, poliacrilamida, poli(acetato de vinilo), vidrio o papel (nitrocelulosa). Estos soportes están en forma de placas (microplacas), de hojas, de cintas o de partículas (bolas). La inmovilización de reactivos sobre el soporte puede realizarse mediante la formación de un puente entre el reactivo y una molécula que está acoplada al soporte (hidrazida, proteína A, glutaraldehído, carbodiimida o lisina) según técnicas convencionales.

25 Los reactivos según la invención son utilizables en métodos de diagnóstico que emplean técnicas de inmunoquímica convencionales, por ejemplo: EIA, ELISA, RIA, inmunofluorescencia, inmunoaglutinación, inmunocromatografía, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, inmunotransferencia e inmunoprecipitación.

30 La presente divulgación tiene igualmente como objeto el uso de un anticuerpo humanizado de clase IgG o un fragmento de este anticuerpo, tales como se definen anteriormente, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención y al tratamiento de una patología seleccionada del grupo constituido por: enfermedades infecciosas, cánceres, intoxicaciones, alergias y rechazos de injerto. La presente divulgación tiene igualmente como objeto el uso de un anticuerpo humanizado de clase IgG o un fragmento de este anticuerpo, tales como se definen anteriormente, para la preparación de un reactivo destinado al diagnóstico de una patología seleccionada del grupo constituido por enfermedades infecciosas y cánceres.

35 Además de las disposiciones precedentes, la divulgación comprende también otras disposiciones que surgirán de la descripción siguiente, que se refiere a ejemplos de obtención y uso de los ratones transgénicos según la presente invención, así como a los dibujos adjuntos en los que:

- 40 - La figura 1 ilustra la estructura del locus de IgH modificado obtenido mediante recombinación homóloga entre el locus de IgH de múrdo y el vector de orientación denominado p-gamma1 KI, que comprende: i) un fragmento de 6860 pb del gen de inmunoglobulina gamma1 humano incluyendo los exones codificantes de los dominios constantes CH1, bisagra ("hinge"), CH2 y CH3 y los exones de membrana m1 y m2 de la cadena pesada de inmunoglobulina γ 1, ii) un módulo neo rodeado de sitios LoxP, iii) secuencias flanqueantes homólogas de una porción del locus de múrdo de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas con un fragmento en dirección 5' de aproximadamente 5 kb correspondiente a la región JH-E μ (fragmento DQ 52/JH) y en dirección 3' otro fragmento de aproximadamente 5 kb correspondiente al gen C μ (fragmento C μ). Se indican los sitios *EcoRI*, así como la posición de la sonda (3' *muXbaI-EcoRI*) que hibrida fuera del sitio de recombinación homóloga, en 5' del gen constante IgH delta (δ) y de su sitio *EcoRI*. El alelo recombinante se caracteriza por un fragmento de aproximadamente 7,5 kb que representa el fragmento μ de múrdo y el módulo neo, mientras que el alelo silvestre se caracteriza por un fragmento de 12 kb.
- 50 - La figura 2 representa la secuencia del fragmento de 6860 pb (SEQ ID NO: 13) del gen de inmunoglobulina gamma1 humano insertado en el locus de IgH de ratones transgénicos Gammaprim. Los exones codificantes de los dominios constantes CH1, bisagra ("hinge"), CH2 y CH3 y los exones de membrana m1 y m2 de la cadena pesada de inmunoglobulina γ 1 se indican en negrita. Los sitios de corte y empalme 5' y 3' se subrayan y los sitios de poliadenilación se indican en negrita y subrayados. Las secuencias correspondientes a los cebadores Gam1 CH1-5'F y Gam1 mbexon-3'R se indican en gris.

- 5 - La figura 3 ilustra el análisis por transferencia Southern del ADN genómico de clones de CE transfectados con el vector de orientación p-gamma1 KI; se hibrida el ADN genómico digerido con *EcoRI* con una sonda correspondiente a la región 5' del gen δ . **1.** Clon recombinante (nº 153). **2.** ADN genómico silvestre. **3.** Subclón procedente del clon nº 153. **4.** Subclón procedente del clon nº 153. La presencia de un fragmento de 7,5 kb indica que el clon ha integrado el transgén γ 1 humano mediante recombinación homóloga. En comparación, está presente un fragmento de 12 kb en el ADN genómico silvestre.
- 10 - La figura 4 ilustra el análisis por transferencia Southern del ADN genómico de cola de ratón; se hibrida el ADN genómico digerido con *EcoRI* con una sonda situada en 5' del gen δ . **A.** Ratón silvestre (WT). **B.** γ 1-KI heterocigótico. **C.** γ 1-KI heterocigótico. **D.** γ 1-KI homocigótico "floxeado" (escisión del gen neo por la recombinasa Cre). El alelo recombinante corresponde a un fragmento de aproximadamente 7,5 kb que representa el fragmento μ de múrido y el módulo neo. El alelo recombinante "floxeado" corresponde a un fragmento de aproximadamente 5,5 kb que representa el fragmento μ de múrido solo (sin el módulo neo). El alelo silvestre corresponde a un fragmento de 12 kb.
- 15 - La figura 5 ilustra el análisis por citometría de flujo de la expresión membranal de IgG1 humanas en la superficie de linfocitos esplénicos de un animal homocigótico de la estirpe transgénica Gammaprim en comparación con un animal de control. Se marcaron los linfocitos esplénicos con anticuerpos específicos de CD19 (marcador específico de linfocitos B) y IgG1 humanas. Para el análisis por citometría, se estableció una ventana en los linfocitos CD19+.
- 20 - La figura 6 ilustra el análisis por ELISA de la respuesta de anticuerpos de IgG1 humanos específicos de un animal de la estirpe Gammaprim inmunizado con el antígeno p24 de VIH. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA) de IgG1 anti-p24 en función del tiempo en días (las flechas representan la primera inmunización a D0, y después los recuerdos).

Ejemplo 1: Obtención y caracterización genotípica de la estirpe de ratones transgénicos homocigóticos de la mutación Gammaprim

- 25 Se insertó el gen de la cadena pesada de inmunoglobulina gamma1 humana, incluyendo los exones codificantes de los dominios CH1, bisagra ("hinge"), CH2 y CH3 y los exones de membrana (m1 y m2), por recombinación homóloga en lugar de la región de conmutación S μ de la cadena pesada de múrido (S μ), de forma que se bloqueara la clase de conmutación hacia los genes constantes de inmunoglobulinas situados en dirección 3' de C μ en el locus endógeno (locus de IgH de múrido, figura 1). La región diana anula la expresión del gen μ endógeno responsable de la síntesis de cadenas pesadas de IgM y disminuye igualmente de forma drástica la de otros genes de cadenas pesadas de inmunoglobulinas. Como consecuencia, la estirpe transgénica obtenida produce una gran cantidad de IgG quiméricas cuyo dominio constante humanizado corresponde al isotipo IgG1.

1) Construcción del vector de orientación de la recombinación homóloga

- 35 Se realizaron las construcciones plasmídicas a partir del plásmido Bluescript SK (pSK) (STRATAGENE) y de la cepa bacteriana de *E. coli* TG1 (STRATAGENE), usando los protocolos clásicos de preparación, clonación y análisis del ADN tales como los descritos en "Current Protocols in Molecular Biology" (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and Son Inc, Biblioteca del Congreso, EE.UU.).

- 40 El vector de recombinación homóloga o vector de orientación derivado de pSK, denominado p-gamma1 KI (figura 1), comprende: i) un fragmento de 6860 pb (SEQ ID NO: 13) del gen de inmunoglobulina gamma1 humano, incluyendo los exones codificantes de los dominios constantes CH1, bisagra ("hinge"), CH2 y CH3, y los exones de membrana m1 y m2 de la cadena pesada de inmunoglobulina γ 1 (figura 2), ii) un módulo neo (fragmento de 1,6 kb), iii) secuencias flanqueantes homólogas de una porción del locus de múrido de cadenas pesadas de inmunoglobulinas con un fragmento, en dirección 5', de aproximadamente 5 kb correspondiente a la región JH-E μ (fragmento DQ 52/JH) y en dirección 3' otro fragmento de aproximadamente 5 kb correspondiente al gen C μ (fragmento C μ).

- 45 De manera más precisa, se insertaron los diferentes fragmentos en el plásmido Bluescript SK, según las etapas siguientes:

- En una primera etapa, se amplificó el fragmento C μ correspondiente a las posiciones 140101 a 145032 de la secuencia de Genbank AC073553 (SEQ ID NO: 12) por PCR con la ayuda de cebadores específicos apropiados y se clonó después en el sitio *XhoI* de pSK, dando el plásmido pA.
- 50 - En una segunda etapa, se amplificó el fragmento DQ 52/JH correspondiente a las posiciones 131281 a 136441 de la secuencia de GenBank AC073553 (SEQ ID NO: 11) por PCR con la ayuda de cebadores específicos apropiados y se clonó después en 5' del fragmento C μ , entre los sitios *EcoRV* y *ClaI* del plásmido pA, dando el plásmido pB.
- 55 - En una tercera etapa, se insertó el módulo neo descrito en Pinaud *et al.*, *Immunity*, 2001, 15, 187-199, en el sitio *Sall* entre DQ52/JH y C μ , dando el plásmido pC.

- 5
- En una cuarta etapa, se amplificó el fragmento C γ 1 de 6860 pb flanqueado por adaptadores *Clal* y que contiene el gen gamma1 humano en una sola etapa de PCR de fragmento grande con la ayuda del par de cebadores **Gam1 CH1-5'F** (5' caatcgatgcccgtagcccgagac 3', SEQ ID NO: 1) y **Gam1 mbexon-3'R** (5' aaatcgatgctccatcaccgaagtacaa 3', SEQ ID NO: 8) y se verificaron después las secuencias del conjunto de regiones codificantes y de los sitios de corte y empalme por PCR con la ayuda de los cebadores siguientes:
 - **Gam1 CH1-5'F:** (SEQ ID NO: 1)
 - **Gam1 CH1-3'R:** 5' gcttcagcagagacaccct 3' (SEQ ID NO: 2)
 - **Gam1 CH2-5'F:** 5' cagctcggacaccttctc 3' (SEQ ID NO: 3)
 - **Gam1 CH2-3'R:** 5' ccggcctctgtccatgtg 3' (SEQ ID NO: 4)
 - 10 - **Gam1 CH3-5'F:** 5' cacatggacagaggccgg 3' (SEQ ID NO: 5)
 - **Gam1 CH3-3'R:** 5' ctgacccgtggaaagaac 3' (SEQ ID NO: 6)
 - **Gam1 mbexon-5'F:** 5' agctgacctcaggacatt 3' (SEQ ID NO: 7)
 - **Gam1 mbexon-3'R** (SEQ ID NO: 8)

15 Finalmente, en una última etapa, se insertó el fragmento C γ 1 de 6860 pb flanqueado por adaptadores *Clal* y que contenía el gen gamma1 humano así obtenido entre el fragmento JH y el módulo neo en el sitio *Clal* del plásmido pC, dando el vector de orientación denominado p-gamma1 KI.

Se verificó la secuencia de p-gamma1 KI por secuenciación automática y por análisis de restricción con las enzimas *Clal* y *XhoI*, confirmando que el vector era apto para permitir una recombinación homóloga tal como la esquematizada en la figura 1.

20 **2) Transfección de CE e inyección en blastocitos**

Se transfectaron CE por electroporación del ADN de p-gamma1 KI linealizado en el sitio *NotI*. Se extrajeron los clones seleccionados en presencia de geneticina y se analizó el ADN genómico digerido con *EcoRI* por transferencia Southern con la ayuda de una sonda radiactiva que hibrida fuera del sitio de recombinación homóloga, en 5' del gen constante IgH delta (δ) y de su sitio *EcoRI* (figura 1); esta sonda denominada 3'*muXbaI-EcoRI*, amplificada por PCR con la ayuda de cebadores específicos apropiados, corresponde a las posiciones 145032 a 145945 de la secuencia de Genbank AC073553.

Se visualiza la presencia de un alelo recombinante por un fragmento de aproximadamente 7,5 kb (que representa el fragmento μ de múrido y el módulo neo), mientras que el alelo silvestre corresponde a un fragmento de 12 kb (figura 3). En estas condiciones, de 192 clones analizados, se reveló positivo 1.

30 La verificación del cariotipo de dos de los cuatro clones recombinantes no mostró ninguna anomalía cromosómica (aneuploidía).

Se inyectó este clon en los blastocitos de ratón C57/Black 6 usando los protocolos clásicos de transgénesis tales como los descritos en "Transgenic Mouse: Methods and Protocols", anteriormente citado. Se obtuvo una quimera macho que presentaba un grado de quimerismo elevado, y se apareó con hembras C57/Black 6 con el fin de obtener animales heterocigóticos, que se analizaron por transferencia Southern (Figura 4), PCR y ELISA. Se obtuvo a continuación una estirpe de ratones homocigóticos del locus de IgH recombinado (Figura 4), denominada de aquí en adelante estirpe gamma1 modificada génicamente, gamma1-KI, γ 1KI o Gammaprim por cruzamiento de los animales heterocigóticos.

40 **3) Detección del locus de IgH recombinado portador del gen C μ humano (alelo gamma1-KI) y del locus de IgH silvestre (alelo μ silvestre) por PCR**

Se analizó por PCR el ADN genómico de una muestra de cola de animales homocigóticos, obtenidos como se precisa anteriormente, con la ayuda de los dos pares de cebadores siguientes:

- par específico del locus de IgH de múrido no mutado (alelo μ silvestre):
- **cebador UpstreamSpeISmu:** 5' gag tac cgt tgt ctg ggt cac 3' (SEQ ID NO: 14)

- cebador Sacl-3'Imu: 5' gag ctc tat gat tat tgg tta ac 3' (SEQ ID NO: 15)

Se realizó la reacción de amplificación con una temperatura de hibridación de 61 °C. Esta reacción amplifica en 30 ciclos un fragmento de 91 pares de bases que encierran el sitio *Spe I* específico del locus de IgH de múrido no mutado.

5 - par específico del locus de IgH recombinante portador del gen C γ 1 humano (alelo gamma1 modificado génicamente o gamma1-KI)

- cebador Neo1: 5' gca tga tct gga cga aga gca t 3' (SEQ ID NO: 16)

- cebador Neo2: 5' tcc cct cag aag aac tcg tca a 3' (SEQ ID NO: 17)

10 Se realizó la reacción de amplificación con una temperatura de hibridación de 55 °C. Esta PCR amplifica en 30 ciclos un fragmento de 120 pares de bases específico del locus de IgH recombinado portador del gen C γ 1 humano (mutación gamma1 modificada génicamente o gamma1-KI).

Los animales de la estirpe Gammaprim son sistemática y simultáneamente negativos por PCR con los cebadores específicos del alelo μ silvestre y positivos por PCR con los cebadores específicos del alelo gamma1 modificado génicamente.

15 **Ejemplo 2: Caracterización fenotípica de la estirpe de ratones transgénicos homocigóticos de la mutación Gammaprim**

1) Titulación de los índices de IgM de múrido e IgG1 humanas séricas totales por nefelometría y ELISA.

a) Nefelometría

20 Se titularon las IgG1 humanas séricas por nefelometría con un robot BNII™ (BEHRING) usando el kit de titulación de IgG1 (BEHRING) según las recomendaciones del suministrador.

Las titulaciones de IgG1 humanas séricas dieron resultados totalmente correlacionados con los del genotipo realizado por pruebas de PCR:

- Los animales de control no mutantes tienen un índice nulo de inmunoglobulinas humanas de clase IgG1.
 - Los animales homocigóticos γ 1-KI tienen siempre un índice significativo de IgG1 humanas, variando este índice entre 0,5 y 1 g/l en el suero. En contraposición, las IgM de múrido son indetectables en el suero de estos animales.
- 25

b) ELISA

30 Se confirmaron los resultados obtenidos por nefelometría por ELISA siguiendo las etapas siguientes: se incubaron los anticuerpos no marcados anti-IgG humanas (monoclonal anti-IgG humana, SIGMA) o anticuerpos no marcados anti-IgM de múrido (Southern Biotechnologies Associates) diluidos a 1/1000 (anti-IgG humana) o a 1/500 (anti-IgM de múrido) en tampón carbonato 0,1 M, pH 8,3 durante una noche a +4 °C en placas de 96 pocillos (Maxisorb™, NUNC; 100 μ l/pocillo). Después de 3 lavados con tampón PBS que contiene 0,1 % de Tween (PBS-Tween 0,1 %), se saturaron las placas en presencia de PBS que contenía 3 % de seroalbúmina bovina (BSA; 100 μ l/pocillo). Después de 3 lavados con tampón PBS-Tween 0,1 %, se añadieron los sueros para ensayar diluidos a 1/100 y a 1/1000 en tampón PBS que contenía 1 % de BSA (100 μ l/pocillo) y se incubaron las placas durante 3 horas a 37 °C. Después de 3 lavados con tampón PBS-Tween 0,1 %, se añadieron un antisuero anti-IgG humanas marcado con fosfatasa alcalina (monoclonal anti-IgG-AP humana, SIGMA) o un suero anti-IgM de múridos marcado con fosfatasa alcalina (Biosys) diluidos a 1/1000 en PBS-Tween 0,1 % (100 μ l/pocillo), y se incubaron las placas durante 3 horas a 37 °C. Después de 3 lavados con tampón PBS-Tween 0,1 %, se revelaron las IgG humanas e IgM de múrido fijadas mediante la adición de sustrato de fosfatasa alcalina (fosfato de p-nitrofenilo, SIGMA) a 1 mg/ml en tampón Tris 0,2 M, pH 7,0. Se bloqueó la reacción mediante la adición de sosa 3 N (30 μ l/pocillo) y se efectuó después la lectura con la ayuda de un espectrómetro a una longitud de onda de absorción de 405 nm.

35

40

45 Se obtienen los datos cuantitativos mediante extrapolación con una gamma de suero patrón (BEHRING) para la titulación de IgG1 humanas, y una IgM monoclonal de múrido (SOUTHERN BIOTECHNOLOGIES ASSOCIATES) para la titulación de las IgM de múrido.

La titulación de IgG séricas por ELISA muestra una diferencia significativa entre los homocigóticos y los heterocigóticos; los sueros de homocigóticos diluidos a 1/500 contienen 0,8 g/l de IgG1 humanas, mientras que se observan valores muy bajos (0,03 g/l) para los sueros de heterocigóticos incluso a la dilución más baja (a 1/100). Al contrario, cuando se titulan las IgM de múrido por ELISA, se observa un índice normal de IgM de múrido (del orden

de 1 g/l) en los ratones de control "no mutantes", al igual que en los animales heterocigóticos de la mutación Gammaprim. En contraposición, el índice de IgM de múrido es nulo en los animales homocigóticos de Gammaprim.

2) Análisis de la expresión de un receptor membranal de la clase de IgG humanas en la superficie de linfocitos esplénicos de la estirpe Gammaprim

5 Se fenotiparon los animales homocigóticos portadores de la mutación γ 1-KI por citometría de flujo mediante doble marcaje con la ayuda de anticuerpos específicos de IgG1 humanas marcadas con Alexa633 o IgM de múrido marcadas con fluoresceína, y anticuerpos específicos de linfocitos B (anticuerpo anti-CD19) marcados con ficoeritrina. De manera más precisa:

10 - Preparación de células linfoides: Se eligió el bazo, órgano linfoide secundario, para este experimento. Se extrajo este órgano en diferentes animales mutantes homocigóticos γ 1-KI y después se desgarró en tampón Versène (Invitrogen) y se filtró por tamiz (40 μ m) con el fin de obtener una suspensión de células individuales desprovista de agregados celulares. Se centrifugaron entonces las células esplénicas y se sometieron a una etapa suplementaria de choque osmótico con el fin de lisar los glóbulos rojos mediante la una nueva puesta en suspensión del sedimento celular en 1 ml de agua destilada. Se volvieron a poner inmediatamente en suspensión las células de las muestras en medio completo (RPMI + 10 % de suero de ternero fetal), se contaron y se conservaron en hielo.

15 - Marcaje con la ayuda de anticuerpos fluorescentes: Se incubaron 10^5 células durante 30 minutos a 4 °C con una dilución de 1/100 de un anticuerpo anti-IgM de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (Southern Biotechnologies), un anticuerpo anti-IgG humanas acoplado con Alexa 633 y un anticuerpo específico de linfocitos B (anticuerpo anti-CD19) marcado con ficoeritrina. Se lavaron a continuación las células con 5 ml de PBS, se decantó después el sobrenadante y se volvieron a poner en suspensión las células en 100 μ l de PBS, 0,5 % de BSA, EDTA 0,1 mM.

20 - Análisis por citofluorimetría: Se analizaron las células marcadas con la ayuda de un citómetro de flujo (COULTER XLTM).

25 Los resultados de la citometría de flujo están de acuerdo con los de la titulación de inmunoglobulinas séricas. En los animales homocigóticos de la estirpe gamma1-KI, no se detecta ninguna expresión de IgM de múrido. No obstante, en ausencia de expresión de IgM, un compartimento de linfocitos B periféricos CD19+ es capaz de diferenciarse en estos animales y representa un 6 % de los linfocitos esplénicos. Estos linfocitos B periféricos expresan un 40 % de ellos una inmunoglobulina membranal de la clase de IgG1 humanas (figura 5).

3) Producción de anticuerpos específicos de la línea Gammaprim

a) Inmunización

35 Se inmunizaron los animales una primera vez por inyección intraperitoneal de 20 μ g de antígeno p24 (proteína de nucleocápsida de VIH-1) diluido en 200 μ l de suero fisiológico y puesto en emulsión con 200 μ l de coadyuvante completo de Freund (SIGMA). Cada 2 semanas, los animales experimentaron una vacuna de recuerdo por inyección intraperitoneal de 20 μ g de antígeno p24 diluido en 200 μ l de suero fisiológico y puesto en emulsión con 200 μ l de coadyuvante incompleto de Freund (SIGMA).

b) Titulación de anticuerpos específicos del antígeno p24

Se investigó la presencia de anticuerpos específicos del antígeno p24 por ELISA 2 semanas y después 4 semanas después de la segunda inyección del antígeno siguiendo la técnica siguiente:

40 - adsorción del antígeno p24 (1 μ g/ml en tampón carbonato 0,1 M, pH 8,3) sobre placas de 96 pocillos (Maxisorb, NUNC; 100 μ l/pocillo) mediante incubación durante una noche a 4 °C,

- 3 lavados con PBS-Tween 0,1 %,

- saturación de las placas con medio completo (PBS, 3 % de BSA, 100 μ l/pocillo),

- 3 lavados con PBS-Tween 0,1 %,

45 - distribución de los sueros para ensayar diluidos a 1/100 y a 1/200 en tampón (PBS, 1 % de BSA; 100 μ l/pocillo),

- incubación durante 3 horas a 37 °C,

- 3 lavados con PBS-Tween 0,1 %,

50 - distribución de un antisuero anti-IgG humanas marcado con fosfatasa alcalina (monoclonal anti-IgG-AP humana, SIGMA) diluido a 1/1000 (100 μ l/pocillo)

- 3 lavados con PBS-Tween 0,1 %,
- revelado de la reacción enzimática por adición de fosfato de p-nitrofenilo en tampón TRIS 0,2 M (SIGMA),
- bloqueo de la reacción por adición de sosa 3 N (30 µl/pocillo),
- lectura por espectrometría de una longitud de onda de absorción de 405 nm,

5 Se expresa el índice de anticuerpos de IgG anti-p24 en unidades arbitrarias (UA) establecidas para la media de sueros diluidos a 1/100 y 1/200 en función de la relación de densidad óptica del suero ensayado/densidad óptica del suero de control.

10 Se detectó la presencia de anticuerpos específicos del antígeno p24 mediante ELISA a partir del D26 (después de 2 inmunizaciones- 100 UA) y se demuestra en gran medida a D47 (3 semanas después de la 2ª inyección del antígeno- 450 UA; figura 6). En comparación, se ha verificado que, en ausencia de inmunización de los animales, el índice de anticuerpos de IgG1 anti-p24 quedaba inferior a 5 unidades.

Ejemplo 3: Obtención y caracterización de la estirpe transgénica doble Gammaprim/kappa que expresa una cadena pesada gamma1 quimérica y una cadena ligera kappa de inmunoglobulinas humanas

15 El cruzamiento de estirpes de κARN que expresan una cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana, tal como se describe en la solicitud internacional PCT WO 2005/047333, y gamma1-KI descrita en los ejemplos precedentes, genera ratones transgénicos dobles Gammaprim/kappa.

20 Para hacer esto, se cruzaron entre sí los animales homocigóticos de la mutación gamma1-KI y homocigóticos del transgén κARN. En la primera generación (F1) después de este cruzamiento, todos los animales obtenidos son heterocigóticos de la mutación gamma1-KI y heterocigóticos del transgén κARN. Estos animales de F1 se cruzaron por tanto de nuevo: en la generación siguiente (F2), las leyes de la genética mendeliana permiten obtener 1 animal de 4 homocigótico de la mutación gamma1-KI y 1 animal de 4 homocigótico del transgén κARN. Entre estos animales de F2, se pudo seleccionar por lo tanto 1 animal de 16 como portador a la vez de la mutación gamma1-KI en estado homocigótico y como portador del transgén κARN en estado homocigótico. Estos animales son los fundadores de la estirpe Gammaprim/kappa y transmiten de forma estable a su descendencia los genes que permitan la producción simultánea de una cadena pesada gamma1 humanizada como reemplazo de la producción de IgM de muridos, así como la producción y diversificación por hipermutación de una cadena κ humana.

Esta estirpe de ratones transgénicos dobles se denomina estirpe Gammaprim/kappa

a) Presencia del transgén κ

30 Se siguió la transmisión del transgén κARN en el transcurso de cruzamientos de ratones transgénicos por transferencia Southern con la ayuda de una sonda específica de la región Cκ humana (fragmento *EcoRI-EcoRI* de 2,5 kb que incluye la totalidad del exón de Cκ humano).

35 Se detectó la expresión del transgén κ en los animales mutantes mediante titulación por ELISA de las cadenas kappa libres humanas eliminadas en las orinas de los animales. De manera más precisa: se incubaron placas de 96 pocillos (Maxisorb®, NUNC) durante 1 noche a +4 °C en presencia de un anticuerpo no marcado anti-κ humana (Kallestad) diluido a 1/1000 en tampón carbonato 0,1 M pH 8,3 (100 µl/pocillo). Después de 3 lavados con tampón PBS que contenía 0,1 % de Tween (PBS-Tween 0,1 %), se saturaron las placas en presencia de PBS que contenía suero fetal de ternero al 10 % (100 µl/pocillo). Después de 3 lavados con tampón PBS-Tween 0,1 %, se añadieron las muestras de orina para ensayar, diluidas a 1/100 y a 1/500 en tampón PBS que contenía suero fetal de ternero al 10 % (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas durante 3 horas a 37 °C. Después de 3 lavados con tampón PBS-Tween 0,1 %, se añadió un antisuero anti-κ humana marcado con fosfatasa alcalina (SIGMA) diluido a 1/1000 en PBS-Tween 0,1% (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas durante 1 hora a 37 °C. Después de 3 lavados con tampón PBS-Tween 0,1 %, se revelaron las cadenas ligeras kappa humanas fijadas por adición de sustrato de fosfatasa alcalina (fosfato de p-nitrofenilo, SIGMA) a 1 mg/ml en tampón Tris 0,2 M, pH 7,0. Se bloqueó la reacción mediante la adición de sosa 0,5 N (50 µl/pocillo) y se efectuó después la lectura por espectrometría a una longitud de onda de absorción de 405 nm.

50 Como alternativa, se analizó la expresión gel transgén kappa humano por citometría de flujo, mediante doble marcaje con la ayuda de un anticuerpo anti-kappa de murido (marcado con ficoeritrina) junto con un anticuerpo anti-kappa humana (marcado con isotiocianato de fluoresceína) según el protocolo descrito en el ejemplo 2. Los resultados muestran que la presencia del transgén κARN conlleva un fenómeno importante de exclusión alélica tal que entre los linfocitos periféricos más de un 50 % expresan la cadena ligera humana y no reordenan por lo tanto los genes de cadena ligera de murido para expresar una cadena ligera de murido.

b) Homocigosis de la mutación gamma1-KI

5 El primer elemento simple que indica la homocigosis de gamma1-KI es la presencia de un índice elevado de IgG1 humanas en el suero de los animales. Además, se confirmó la homocigosis por PCR mediante la positividad de la "PCR de gamma1-KI" asociada a la negatividad de la "PCR de alelo μ silvestre". Finalmente, después del sacrificio de los animales, el análisis por citometría de flujo permitió mostrar en linfocitos de bazo que la totalidad de los linfocitos B (CD19+) expresan IgG1 humanas membranales, mientras que en paralelo ningún linfocito B expresa IgM de murino.

c) Verificación de la presencia simultánea de la mutación alfa1-KI y del transgén κ ARN en los animales Gammaprim/kappa y su descendencia

10 Se caracterizaron los animales transgénicos dobles Gammaprim/kappa como aquellos que responden simultáneamente a la dos especificidades descritas anteriormente: presencia del transgén κ ARN en estado homocigótico y homocigosis de la mutación gamma1-KI. Además, estos animales se reproducen conservando estas dos especificidades y el fenotipo de su descendencia posee las propiedades siguientes simultáneamente y de forma estable:

- 15
- la producción de IgG1 humanizada a un índice coherente (fácilmente verificable por ELISA o nefelometría en una sola muestra de sangre realizada en animales vivos al nivel del seno retroorbital)
 - la producción de la cadena ligera κ humana (fácilmente verificable por ELISA en una sola muestra de orina realizada en animales vivos).

20 El repertorio de respuesta a los antígenos de estos ratones se espera que sea anormal, ya que se sabe que es esencialmente el dominio VH de la cadena pesada el que contribuye a la formación del sitio de anticuerpo (ahora bien, la cadena pesada transgénica γ 1 humana se beneficia de un repertorio totalmente diversificado, puesto que corresponde al repertorio normal generado por las reordenaciones de segmentos de VH, D y JH del locus de IgH de murino). Estos ratones son capaces de producir anticuerpos de alta afinidad como respuesta secundaria, lo que es el resultado del hecho de que sus linfocitos B pueden agrupar el fenómeno de hipermutación somática a la vez al nivel del gen de cadena pesada y del transgén de cadena ligera κ ARN.

25 Como se deduce de lo anterior, la invención no se limita en absoluto a aquellos modos de empleo, realización y aplicación que se acaban de describir de forma más explícita; abarca por el contrario todas las variantes que puedan ocurrírsele a un especialista en la materia, sin apartarse del marco ni del alcance de la presente invención

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> UNIVERSITE DE LIMOGES
 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
 5 COGNE,Michel
 RAYNAL,Sophie
 COGNE,Nadine
 PINAUD,Eric
- 10 <120> Mamífero no humano transgénico de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulinas humanas de clase G y sus aplicaciones
 <130> F2052PCT1
- 15 <160> 17
 <170> PatentIn versión 3.3
- 20 <210> 1
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
- 25 <220> cebador
 <223> Gam1CH1-5'F
- 30 <400> 1
 caatcgatgc ccgtgagccc agac 24
- 35 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial
- 40 <220> cebador
 <223> Gam1 CH1-3'R
- 45 <400> 2
 gcttccagca gagacaccct 20
- 50 <210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial
- 55 <220> cebador
 <223> Gam1 CH2-5'F
- 60 <400> 3
 cagctcggac accttctc 18
- <210> 4
 <211> 18

ES 2 557 811 T3

<212> DNA
<213> Artificial

5 <220> cebador
<223> Gam1 CH2-3'R

10 <400> 4
ccggcctctg tccatgtg 18

15 <210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

20 <220> cebador
<223> Gam1 CH3-5'F

<400> 5
cacatggaca gaggccgg 18

25 <210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

30 <220> cebador
<223> Gam1 CH3-3'R

<400> 6
ctgacccgtg gaaagaac 18

35 <210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

40 <220> cebador
<223> Gam1 mbexon-5'F

45 <400> 7
agctgacctc aggacatt 18

50 <210> 8
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

55 <220> cebador
<223> Gam1 mbexon-5'F

<400> 8
aaatcgatgc tcccatcacg aagtacaa 28

60 <210> 9
<211> 405
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 557 811 T3

atggacatga gggctcctgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct ctcaggtgcc 60
 agatgtgaca tccagatgac ccagctctcca tcttcctgt ctgcatctgt aggagacgga 120
 gtcaccctca cttgccaggc gagtcaggac attagcgact atttaaattg gtatcagcag 180
 aaagtagggg aagcccctaa gctcctgatg tacgatgcat cataacttga aacaggggtc 240
 ccattaagat tcagtgaag tggatctggg acaaattata gtttcacat cagcagcctg 300
 cagcctgaag attttgaac atattactgt caacagtatt ctaatctccc tttcaccttc 360
 ggccaagga cagcactgga gattaaacga actgtggcac catct 405

<210> 10
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 10
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Ser Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Gly Val Thr Leu Thr Cys Gln Ala Ser
 35 40 45
 Gln Asp Ile Ser Asp Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Val Gly Glu
 50 55 60
 Ala Pro Lys Leu Leu Met Tyr Asp Ala Ser Tyr Leu Glu Thr Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Leu Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Ser Phe Thr
 85 90 95
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110
 Tyr Ser Asn Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
 115 120 125
 Lys Arg Thr Val Ala Pro Ser
 130 135

10

<210> 11
 <211> 5161
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

15

<400> 11

ES 2 557 811 T3

acaggcctga gagaacagac tctggaaata gatgggactt acggagctaa gatctagagc 60
tcatctacag agcagaatcc cagccaagag aacaaagaat actgactctc tcctgttccc 120
tactcctaga gttctaaaac aactataggg gaagggagcc tctagacctc cgtccattcc 180
ccatcttctg cattccatct tcccatgtcc ccaggtctcc aagccacaga caccaccttt 240
cctattcacc cacctttctg tgtccctagg tccccaggcc atagtcacct cccccacac 300
cccgctcacc ctgccccatc tatgccccta gatgcttact taccagagtc ttttgtctga 360
cgtggggcta caagcatcta tgtccctaa gcacctactg ctgacctgta ggaccagct 420
ctgaaccaac tcatataagt aaatacagac tctcccctgt cttaggatgg ccccctgggt 480
caggaggaga cactgcca a ggaaccttct cttagagcac tgaactcctc ccctgtacca 540
cttaggacag acctgagacc tattattact gattaccaga gctctggcag tgaccagga 600
ggagatagat ccaccctgga cacaggaac acagcaccag agatactgct tcatcacaac 660

ES 2 557 811 T3

agtagagtga cacttttagac ttttaatttgg gtcactttcc tgctgtagag gtgggatcag 720
 aaagcaaaga gcagtatgag tgcctgatag gcaccaagt aactataga gtactcatgg 780
 tgaataaggt acctccatgg cttcccaggg aggggactg ccccacccc accatcacag 840
 acctttctcc atagttagata actcagacac aagtgaatga cagatggacc tccatctgct 900
 cttattttta aaagaagaca aaccccacag gctcgagaac tttagcgact gttttgagag 960
 aaatcattgg tccctgactc aagagatgac tggcagattg gggatcagaa taccataact 1020
 ctgtggctag tgtgaggttt aagcctcaga gtccctgtgg tctctgactg gtgcaaggtt 1080
 ttgactaagc ggagcaccac agtgctaact gggaccacgg tgacacgtgg ctcaacaaaa 1140
 accttctggt tggagctctc caggggcagc ctgagctatg aggaagtaga gaggcttgag 1200
 aaatctgagg aagaaaagag tagatctgag aggaaaggta gctttctgga ggtcaggaga 1260
 cagtgcagag aagaacgagt tactgtggac aggtcttaga tggggaaaga atgagcaaat 1320
 gcaagcatca gaagggtgga tgcaatgtcc tgccaaggac ttaccaagag gatccccgga 1380
 cagagcaggc aggtggagtt gactgagagg acaggatagg tgcaggtecc tctcttgttt 1440
 cctttctcct tctcctgttt ccttcttctc ttgtcacagg tctcactatg ctagccaagg 1500
 ctgacctgaa agattacat cctacagatg ggccatcca gttgaattaa ggtggagatc 1560
 tctccaaaca tctgagtttc tgaggcttgg atgccactgg ggacgccaag ggactttggg 1620
 atgggtttgg ttggccccag atgaagggtc acttactggt gtctataatt actctgatgt 1680
 ctaggaccag ggggctcagg tcaactcagg caggtgagtc ctgcatctgg ggactgtggg 1740
 gttcaggtgg cctaaggcag gatgtggaga gagttttagt ataggaacag aggcagaaca 1800
 gagactgtgc tactgggtact tcgatgtctg gggcacaggg accacgggtca ccgtctcctc 1860
 aggtaagctg gcttttttct ttctgcacat tccattctga aacgggaaaa gatattctca 1920
 gatctcccca tgcaggcca tctgccacac tctgcatgct gcagaagctt ttctgtaagg 1980
 atagggctct cactcccag aaaagaggca gtcagaggct agctgcctgt ggaacagtga 2040
 caatcatgga aaataggcat ttacattggt aggtacatg ggtagatggg tttttgtaca 2100
 cccactaaag gggctctatga tagtgtgact actttgacta ctggggccaa ggcaccactc 2160
 tcacagtctc ctcaaggtag tccttacaac ctctctctc tattcagctt aaatagattt 2220
 tactgcattt gttggggggg aaatgtgtgt atctgaattt caggtcatga aggactaggg 2280
 acaccttggg agtcagaaag ggtcattggg agccctggct gacgcagaca gacatcctca 2340
 gctccatac ttcatggcca gagatttata gggatcctgg ccagcattgc cgctagggtcc 2400
 ctctcttcta tgctttcttt gtccctcact ggcctccatc tgagatcatc ctggagccct 2460
 agccaaggat catttattgt caggggtcta atcattgttg tcacaatgtg cctggtttgc 2520
 ttactggggc caagggactc tggctactgt ctctgcaggg gagtccaac ttctccatt 2580
 ctaaagcat gttgggggga ttctgggctc tcaggaccaa gattctctgc aaacgggaat 2640
 caagattcaa cccctttgtc ccaaagttga gacatgggtc tgggtcaggg actctctgcc 2700

ES 2 557 811 T3

tgctggtctg tggtgacatt agaactgaag tatgatgaag gatctgccag aactgaagct 2760
 tgaagtctga ggcagaatct tgtccagggt ctatcggact cttgtgagaa ttaggggctg 2820
 acagttgatg gtgacaatct cagggtcagt gactgtctgg tttctctgag gtgaggctgg 2880
 aatataggtc accttgaaga ctaaagaggg gtccaggggc ttctgcacag gcagggaaca 2940
 gaatgtggaa caatgacttg aatggttgat tcttgtgtga caccaggaat tggcataatg 3000
 tctgagttgc ccaggggtga ttctagtcag actctggggg ttttgcggg tatagaggaa 3060
 aatccacta ttgtgattac tatgctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg 3120
 tctctcagg taagaatggc ctctccagggt cttatatttt aacctttgtt atggagtttt 3180
 ctgagcattg cagactaatc ttggatattt gtccctgagg gagccggctg agagaagttg 3240
 ggaaataaac tgtctagggg tctcagagcc tttaggacag attatctcca catctttgaa 3300
 aaactaagaa tctgtgtgat ggtggttggt gagtcctgg atgatgggat agggactttg 3360
 gaggtcatt tgaagaagat gctaaaacaa tcctatggct ggagggatag ttggggctgt 3420
 agttggagat tttcagtttt tagaataaaa gtattagttg tggaatatac ttcaggacca 3480
 cctctgtgac agcatttata cagtatccga tgcataggga caaagagtgg agtggggcac 3540
 tttctttaga tttgtgagga atgttccgca ctagattgtt taaaacttca tttgttgaa 3600
 ggagagctgt cttagtattg ggtcaaggg agaaagggat ctaccctcg tctcaaaagg 3660
 gtagttgctg tctagagagg tctggtggag cctgcaaaag tccagctttc aaaggaacac 3720
 agaagtatgt gtatggaata ttagaagatg ttgcttttac tcttaagttg gttcctagga 3780
 aaaatagtta aatactgtga ctttaaaatg tgagaggggt ttcaagtact cttttttta 3840
 aatgtccaaa attctgtca atcagtttga ggtcttgtt gtgtagaact gatattactt 3900
 aaagttaaac cgaggaatgg gagtgaggct ctctcataac ctattcagaa ctgactttta 3960
 acaataataa attaagtttc aaatattttt aaatgaattg agcaatggtg agttggagtc 4020
 aagatggccg atcagaacca gaacacctgc agcagctggc aggaagcagg tcatgtggca 4080
 aggctatttg ggaagggaa aataaaacca ctaggtaaac ttgtagctgt ggtttgaaga 4140
 agtggttttg aaacactctg tccagcccca ccaaaccgaa agtccaggct gagcaaaaca 4200
 ccacctgggt aatttgcatt tctaaaataa gttgaggatt cagccgaaac tggagaggtc 4260
 ctcttttaac ttattgagtt caacctttta attttagctt gagtagttct agtttcccca 4320
 aacttaagtt tatcgacttc taaaatgtat ttagaattca ttttcaaat taggttatgt 4380
 aagaaattga aggactttag tgtctttaat ttctaataa tttagaaaac ttcttaaat 4440
 tactctatta ttcttccctc tgattattgg tctccattca attcttttcc aatacccgaa 4500
 gcatttacag tgactttgtt catgatcttt tttagttgtt tgttttgcct tactattaag 4560
 actttgacat tctggtcaaa acggcttcac aaatcttttt caagaccact ttctgagtat 4620
 tcatttttag agaaagactt tttttttaa tgaatgcaat tatctagact tatttcagtt 4680
 gaacatgctg gttggtgggt gagaggacac tcagtcagtc agtgacgtga agggcttcta 4740
 agccagtcca catgctctgt gtgaactccc tctggccctg cttattgttg aatgggcca 4800

ES 2 557 811 T3

aggctctgaga ccaggctgct gctgggtagg cctggacttt gggctctcca cccagacctg 4860
 ggaatgtatg gttgtggcct ctgccacca tccacctggc tgctcatgga ccagccagcc 4920
 tcggtggcct tgaaggaaca attccacaca aagactctgg acctctccga aaccaggcac 4980
 cgcaaatggt aagccagagg cagccacagc tgtggctgct gctcttaaag cttgtaaact 5040
 gtttctgctt aagagggact gagtcttcag tcattgcttt agggggagaa agagacattt 5100
 gtgtgtcttt tgagtaccgt tgtctgggtc actcacattt aactttcctt gaaaaactag 5160
 t 5161

<210> 12
 <211> 4932
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

5

<400> 12
 tagcagggtg tagagggatc tcctgtctga caggaggcaa gaagacagat tcttaccctt 60
 ccatttctct tttatccctc tctggctctc agagagtcag tccttcccaa atgtcttccc 120
 cctcgtctcc tgcgagagcc ccctgtctga taagaatctg gtggccatgg gctgcctggc 180
 ccgggacttc ctgccagca ccatttctt cacctggaac taccagaaca aactgaagt 240
 catccagggt atcagaacct tccaacact gaggacaggg ggcaagtacc tagccacctc 300
 gcagggtgtg ctgtctccca agagcatcct tgaaggttca gatgaatacc tggatgcaa 360
 aatccactac ggaggcaaaa acaaagatct gcatgtgcc attccaggta agaaccaaac 420
 cctcccagca ggggtgccca ggcccaggca tggcccagag ggagcagcgg ggtggggcct 480
 aggccaagct gagctcacac cttgacctt cattccagct gtcgcagaga tgaaccccaa 540
 tgtaaagtgt ttcgtccac cacgggatgg cttctctggc cctgcaccac gcaagtctaa 600
 actcatctgc gaggccacga acttactcc aaaaccgatc acagtatcct ggctaaagga 660
 tgggaagctc gtggaatctg gcttcaccac agatccgggtg accatcgaga acaaaggatc 720
 cacaccccaa acctacaagg tcataagcac acttaccatc tctgaaatcg actggctgaa 780
 cctgaatgtg tacacctgcc gtgtggatca cagggtctc accttcttga agaacgtgtc 840
 ctccacatgt gctgccagtg agtggcctgg gctaagccca atgcctagcc ctcccagatt 900
 agggaagtcc tcctacaatt atggccaatg ccaccagac atggtcattt gctccttgaa 960
 ctttggctcc ccagagtggc caaggacaag aatgagcaat aggcagtaga ggggtgagaa 1020
 tcagctggaa ggaccagcat ctcccttaa gtaggtttgg gggatggaga ctaagctttt 1080
 ttccaacttc acaactagat atgtcataac ctgacacagt gttctcttga ctgcaggctc 1140
 ctccacagac atcctaacct tcaccatccc cccctcctt gccgacatct tcctcagcaa 1200
 gtccgctaac ctgacctgtc tggctcctaaa cctggcaacc tatgaaacct tgaatatctc 1260
 ctgggcttct caaagtgggt aaccactgga aaccaaaatt aaaatcatgg aaagccatcc 1320
 caatggcacc ttcagtgcta aggggtgtggc tagtgtttgt gtggaagact ggaataacag 1380
 gaaggaattt gtgtgtactg tgactcacag ggatctgcct tcaccacaga agaaattcat 1440

10

ES 2 557 811 T3

ctcaaaacc aatggtaggt atccccctt ccttcccc ccaattgcag gacccttctt 1500
 gtacctcata gggagggcag gtcctcttcc accctatcct cactactgtc ttcatttaca 1560
 gaggtgcaca aacatccacc tgctgtgtac ctgctgccac cagctcgtga gcaactgaac 1620
 ctgagggagt cagccacagt cacctgcctg gtgaagggct tctctcctgc agacatcagt 1680
 gtgcagtggc ttcagagagg gcaactcttg cccaagaga agtatgtgac cagtgccccg 1740
 atgccagagc ctggggcccc aggcttctac tttaccaca gcatcctgac tgtgacagag 1800
 gaggaatgga actccggaga gacctatacc tgtgtttag gccacgaggc cctgccacac 1860
 ctggtgaccg agaggaccgt ggacaagtcc actggtaaac ccacactgta caatgtctcc 1920
 ctgatcatgt ctgacacagg cggcacctgc tattgacat gctagcgtc aaccaggcag 1980
 gccctgggtg tccagttgct ctgtgtatgc aaactaacca tgtcagagtg agatgttgca 2040
 tttataaaa attagaaata aaaaaatcc attcaaactg cactggtttt gattatacaa 2100
 tgctcatgcc tgctgagaca gttgtgtttt gcttgcctg cacacacct gcatacttgc 2160
 ctccacctg gcccttctc taccttgcca gtttctcct tgtgtgtgaa ctcagtcagg 2220
 cttacaacag acagagtatg aacatgcgat tctccagct acttctagat atatggctga 2280
 aagcttgctt aacctggtgc aggcagcatt caggcacata tatagacaca catgcattta 2340
 tacatagata tataggtaca catgtgtaga cacatacatg aatgtgtatt catggacaca 2400
 cagacaaagg tacacatata tacacatgag ttcattgcgca cacacatgca tggacactta 2460
 caaacgcctt cagagacaaa taggcataga cacacaacca ctacagaaa cagataccaa 2520
 tatgcatggt cctgtgtaca cagaaacaga ctataggcaa atatacaca ataaactata 2580
 tagatacaaa gatatgcata tacacacatg tacagaaaca tcttcacatg tgtacactaa 2640
 catgtgaaca ggtatagcac acagatacac ctggactctg accagggtg taatctccaa 2700
 ggctcacggc tcagagagcc tacactaggc tgggtcactg atactcctca ggagcccact 2760
 ctatgattgg gagagataac cccaggtaca aagtatgcct atctgtctca acaccatggg 2820
 gcagaagata ctccactaac cacccatgac agaaagttag ccttggctgt gtctccatta 2880
 atagaacacc tcagaagacc aatgtgaaat tgctaacc actcacacc accctgatct 2940
 ccagttcaaa atgcagaaaa cataatgcag ttgtccaaa gatgcccac ccacacacac 3000
 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac accatcaagg 3060
 agcctctgta aggagtcacc acccaataac actgcctctt tgggtcata tcttggacat 3120
 tcttcatatt catatccatt tggggcctag gctttagata tccccaggg ctcatcttta 3180
 cagggatcag agatcccaat aatgcctg gtcccacagc ctccctcagg tatctgtctg 3240
 tttatctctt ggtaccaaga cccaacattg ctggcaggg taggacaagc aacgcacggg 3300
 aactctgatc aaagaaagtc atgagatgcc tgagtcctc aggaagtaag gagggacaac 3360
 ctctggtatc cctgttctta ttgctaaagc ccaagagaca gggagacctg ctctaaattc 3420
 tcagtctaaa cagcaccgat ggcaccacct gctcagggaa agtccagagc acaccaatat 3480

ES 2 557 811 T3

cattttgcca cagttcctga gtctgccttt acccagggtcc atacattgca tctgtcttgc 3540
 ttgctctgct gccccagggc tcctggaaca aaggctccaa attagtgtgt cctacagctt 3600
 ggctgttct gtgcctccgt ctagcttgag ctattagggg accagtcaat actcgctaag 3660
 attctccaga accatcaggg caccccaacc cttatgcaaa tgctcagtca cccaagact 3720
 tggcttgacc ctccctctct gtgtcccttc atagaggggg aggtgaatgc tgaggaggaa 3780
 ggctttgaga acctgtggac cactgcctcc acctcatcg tcctcttcct cctgagcctc 3840
 ttctacagca ccaccgtcac cctgttcaag gtagtgtggt tgtggggctg aggacacagg 3900
 gctgggacag ggagtcacca gtccctactg cctctacctc tactccctac aagtggacag 3960
 caattcacac tgtctctgtc acctgcaggt gaaatgactc tcagcatgga aggacagcag 4020
 agaccaagag atcctccac agggacacta cctctgggccc tgggatacct gactgtatga 4080
 ctagtaaaact tattcttacg tctttcctgt gttgccctcc agcttttacc tctgagatgg 4140
 tcttctttct agactgacca aagacttttt gtcaacttgt acaatctgaa gcaatgtctg 4200
 gccacagac agctgagctg taaacaaatg tcacatggaa ataaatactt tatcttgtga 4260
 actcacttta ttgtgaagga atttgtttg tttttcaaac ctttcctgcg gtgttgacag 4320
 cccaaggatt atctgaatag agcttaggaa ctggaaatgg aacagtgcag tctgatggta 4380
 cttaagggag aaagagggaa aggaggtgtg gaagaagaaa aaagagaagc agagggggag 4440
 gggagaaggg agaggggagag ggagagggag agggagaggg agaggggagag ggagagagag 4500
 agagagagag agagagagag agagagagag agagagcatg cactctaaca gcaaagtaca 4560
 acacaggcag ccaatggata gcactctggt tatctaccct gatggaagaa gggaaagtagg 4620
 gcagagaaaa ttccaggcct aatctcccaa aagcaacaga acctggaaac tagcctctag 4680
 ccttaggtct ctgctctgtc ccagcccac catcttgggc tgggtgttgc tcaagctagt 4740
 aattaggtc ttatcccaaa gctttgtggt atgtgggtgt gcctttgggg agttggctga 4800
 gattttgaag atgtttgtac ctctcccaca acatgacaag ccctaggggt tagtcaataa 4860
 ctcaaattct ctgtctatga caactgctgt atgactatat gaagaaatgg gataaagatg 4920
 ctatagtcac tc 4932

<210> 13
 <211> 6864
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5

<400> 13
 atgcccgtga gccagacac tggacgtga acctcgcgga cagttaagaa cccaggggcc 60
 tctgcgccct gggcccagct ctgtcccaca ccgcggtcac atggcaccac ctctcttgca 120
 gcctccacca agggcccacg ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 180
 ggcacagcag ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg 240
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtcctca 300
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 360

10

ES 2 557 811 T3

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttggtgag 420
 aggccagcac agggagggag ggtgtctgct ggaagccagg ctcagcgtc ctgcctggac 480
 gcatccccgc tatgcagccc cagtccaggg cagcaaggca ggccccgtct gcctcttcac 540
 ccggaggcct ctgccccccc cactcatgct cagggagagg gtcttctggc tttttcccca 600
 ggctctgggc aggcacaggc taggtgcccc taaccaggc cctgcacaca aaggggcagg 660
 tgctgggctc agacctgcca agagccatat ccgggaggac cctgccccctg acctaagccc 720
 accccaaagg ccaaactctc cactccctca gctcggacac cttctctcct ccagattcc 780
 agtaactccc aatcttctct ctgcagagcc caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc 840
 accgtgcccc ggtaagccag ccaggcctc gccctccagc tcaaggcggg acaggtgccc 900
 tagagtagcc tgcattccagg gacaggcccc agccgggtgc tgacacgtcc acctccatct 960
 cttcctcagc acctgaactc ctggggggac cgtcagttct cctcttcccc caaaaccca 1020
 aggacacctt catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc 1080
 acgaagacc tgaggtaaac ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca 1140
 agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg 1200
 tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc aacaaagccc 1260
 tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg tgggaccctg ggggtgagc 1320
 ggccacatgg acagaggccg gctcggccca ccctctgccc tgagagtgac cgctgtacca 1380
 acctctgtcc ctacagggca gccccgagaa ccacagggtg acaccctgcc cccatcccgg 1440
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1500
 gacatcgccc tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgctt 1560
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttctctc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1620
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1680
 tacacacaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataag tgccacggcc ggcaagcccc 1740
 cgctccccag gctctcgggg tcgcgcgagg atgcttgga cgtaccccgt gtacatactt 1800
 cccaggcacc cagcatggaa ataaagcacc cagcgtctcc ctgggcccct gcgagactgt 1860
 gatggttctt tccacgggtc aggccgagtc tgaggcctga gtggcatgag ggaggcagag 1920
 tgggtcccac tgtcccaca ctggcccagg ctgtgcaggt gtgcctgggc cgcttagggt 1980
 ggggctcagc caggggctgc cctcggcagg gtgggggatt tgccagcgtg gccctccctc 2040
 cagcagcagc tgccctgggc tgggccacga gaagccctag gagcccctgg ggacagacac 2100
 acagcccctg cctctgtagg agactgtcct gttctgtgag cgccctgtcc tccgaccgyc 2160
 atgcccactc gggggcatgc ctagtccatg tgcgtagga caggccctcc ctacccatc 2220
 tacccccacg gcaactaacc ctggcagccc tgcccagcct cgcaccgca tggggacaca 2280
 accgactccg gggacatgca ctctcgggcc ctgtggagag actggtccag atgcccacac 2340
 acacactcag cccagaccg ttcaacaaac cccgactga ggttggccgg ccacacggcc 2400
 accacacaca cacgtgcagc cctcacacac ggagcctcac ccgggcgaac cgcacagcac 2460

ES 2 557 811 T3

ccagaccaga gcaaggtcct cgcacacgtg aacactcctc ggacacaggc ccccacgagc 2520
 cccacgcggc acctcaaggc ccacgagccg ctccggcagct tctccacatg ctgacctgct 2580
 cagacaaacc cagccctcct ctccacaaggc gcccttgcag ccgccacaca cacacagggg 2640
 atcacacacc acgtcacgtc cctggccctg gcccaacttc cagtgcggcc ctccctgca 2700
 gctgggggtca catgaggtgt gggcttcacc atcctcctgc cctctgggcc tcagggaggg 2760
 acacgggaga cggggagcgg gtcctgctga gggccaggtc gctatctagg gccgggtgtc 2820
 tggctgagcc ccggggccaa agctgggtgc cagggcgggc agctgtgggg agctgacctc 2880
 aggacattgt tggcccatcc cggccgggcc ctacatcctg ggtcctgcca cagagggaat 2940
 cccccccaga ggcccaagcc cagggggaca cagcaactgac ccccccttc ctgtccagag 3000
 ctgcaactgg aggagagctg tgcggaggcg caggacgggg agctggacgg gctgtggacg 3060
 accatcacca tcttcatcac actcttctc ttaagcgtgt gctacagtgc caccgtcacc 3120
 ttcttcaagg tcggccgcac gttgtcccca gctgtccttg acattgtccc ccatgctgtc 3180
 aaaaactgtc tctgacactg tcccacaggc tgtccccacc tgtccctgac gctgtcccc 3240
 atgtctcac aaactgtccc tgacattgtc cccaatgctg cccccactg tccaacagtg 3300
 tccccaggc tctccccaca tgtccccgac actgtcccc atgtgttccc catctgtccc 3360
 caaactgtc ccccaccctg tcccccttg tcccacacac tgtccccac agtttccacc 3420
 tgtccctgac actgtcccc atgtttccc cactgtccc tgacaccatc ccccactctg 3480
 tccccatag ttcttgccc tgtccccac gctgtcccct acagtacctg gcaactgtccc 3540
 ccatgctgtc ccctcctgta tgaaaccctg tcccacatgc tgtccccacc tgtccgtgac 3600
 aatatcccc aactgttccc cactgttccc cgacactctc ctccacgtg ttcttaccta 3660
 aaccgcagac ttctctccat gctgtcccca cccatctccg aactgtacc ccacgttgtc 3720
 cccactgtc ctcaaacactg tccccatgc tgtccccacc tgtccccaac actctcctcc 3780
 atgtgttccc cactgttccc tgatattgtc cccatgacg tctccactg tccccaatgc 3840
 tgtccccag gctgtacctc ccagtacaac actgtcccc atgtgttccc cactgttccc 3900
 tgacactgtc ccccacgctg tccccctc tccccgacac tgtccccac actgtcccc 3960
 cctgtcccca aactatcct ccatgctgtc ccctcctgtc cccactgtc ccctacactg 4020
 tccccatgc tgtccccacc agtccccaaa actttcctcc aactgttccc cactgttccc 4080
 caaactgtc ccccacgcta tccccctgt ccccgacaat gtccccactg ttctcctctg 4140
 ttctctcta tccctgacac tgtccgccat gctgtcccca cctgtccctg aactgtctc 4200
 cactctgtc ccctataatc cctgacactg tccccacgc cgtccccctc cgtatgcacc 4260
 actgtcccc aagctgtccc cactgtcct caacacagtc cccatgctg tccccactg 4320
 tccccacac tctctccat gtccccacct gtccctgata ttgtcccca tgcagtcccc 4380
 acctgtcccc gatgctgtc cccgggctgt acctaccagt ccaaacactg cccccacact 4440
 ctccccact gtccctgata ctgtcccca tgtgttccc acctgtccc gacactgttc 4500

ES 2 557 811 T3

tccacgtctt cccctctgtt ccttgacact gtccccaca ctgtccccac ctgtccccaa 4560
 cactatcctc catcctgtcc caacctgtct cctacactgt ccccatgtct gtccccacca 4620
 gtccccaa ca ctgtcctcca tgctgtcccc catgtcccc acaactgtccc ccatgctatc 4680
 tcccctgtcc ctgacaatgt ccccactgtt tcctgtcccc tcctatccct gacactgtcc 4740
 cccatgtctgt ccccacctgt cccccacatg gtctccaccg gtcccctgaca ctgtctccca 4800
 ctctgtcccc tataatccct gacactgtcc cccacaccgt cccctcctgt atgcaccact 4860
 gtcccccatg ctgtccccac ctgtcccctga tgctgtcctc cacacagtcc ccacctctcc 4920
 ctgacactgt ccccatctct cccaacact ctctccatg ctgtccttaa ctgtccccaa 4980
 cactcttcca cactctgtct ccacctgtcc ctgacactgt cccccacact gtctcaccct 5040
 gtgtctgaca ctgtccccca cgctgtcccc acctgtccct gacgtgtct tctgtgtgt 5100
 ccacatgctg ttggtgccct ggctctgtct tctatcacca agcctcagag caggcagtgg 5160
 tgaggccatg gcaacctgggt ggcattgagg gccggatggg cctcaggggc agggctgtgg 5220
 cctgcgtgga ctgacgggtg ggtgggcctt gggggcagag aggtggcctc agtgccctga 5280
 ggggtgggtg gggctcgggg gcagggctgt ggcctcgtc acccctgtgc tgtgccttgc 5340
 ctacagtgga agtgatctt ctctcgtgt gtggacctga agcagaccat catccccgac 5400
 tacaggaaca tgatcggaca gggggcctag ggccaccctc tgcgggggtg ccagggccgc 5460
 ccagacccca cacaccagcc atgggccatg ctacgccacc acccaggcca cacctgcccc 5520
 cgacctcacc gccctcaacc ccatgactct ctggcctcgc agttgccctc tgacctgac 5580
 acacctgaca cccccctt ccagaccctg tgcatagcag gtctaccca gacctccgt 5640
 gcttggtgca tgcagggcac tgggggccag gtgtcccctc agcaggacgt ccttgccctc 5700
 cggaccacaa ggtgtcaca caaaggagg cagtgaccgg tatcccaggc ccccaccag 5760
 gcaggacctc gccctggagc caaccccgtc cacgccagcc tcctgaacac aggcgtggtt 5820
 tccagatggt gagggggagc gtcagccgcc aaggtaggga agccacagca ccatcaggcc 5880
 ctgttgggga ggcttccgag agctgcgaag gctcactcag acggccttcc tcccagccc 5940
 cagccagcca gcctccattc cgggactcct cgtgaactcc tgacatgagg aatgaggttg 6000
 ttctgatttc aagcaagaa cgctgtctc tggctcctgg gaacagtctc agtgccagca 6060
 ccaccccttg gctgcctgcc cacactgtct gattctcggg tggaaactgga cccgcaggg 6120
 cagccagccc cagagtccgc actggggaga gaaggggcca ggccaggac actgccacct 6180
 cccacccact ccagtccacc gagatcactc agagaagagc ctgggcatg tggccgctgc 6240
 aggagccca cagtgcaagg gtgaggatag cccaaggaag ggctgggcat ctgcccagac 6300
 aggcctccca gagaaggctg gtgaccaggt cccaggcggg caagactcag ccttggtggg 6360
 gcctgaggac agaggaggcc caggagcatc ggggagagag gtggagggac accgggagag 6420
 ccaggagcgt ggacacagcc agaactcatc acagaggctg gcgtccagcc cggggtcacg 6480
 tgcagcagga acaagcagcc actctggggg caccaggtgg agaggcaaga cgacaaagag 6540
 ggtgccctgt ttcttgcaaa agcagggtct ctggccacga gtgtggaca gaggcccca 6600
 cgctctgtct cccccatcac gccgttccgt gactgtcacg cagaatctgc agacaggaag 6660
 ggagactcga gcgggagtg gcgccagcgc tgctcggcc gtcagggagg actcctgggc 6720
 tcaactgaag gaggtgccac catttcagct ttggtagctt ttcttcttct tttaaatctt 6780
 ctaaagctca ttaattgtct ttgatgttc tttgtgatg acaataaaat atccttttta 6840
 agtcttgtagc ttcgtgatgg gagc 6864

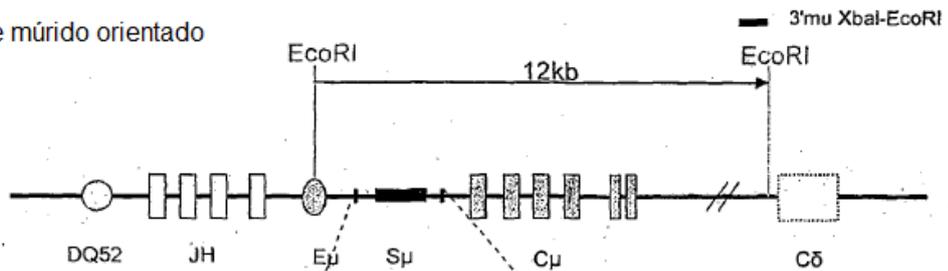
ES 2 557 811 T3

<210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5
 <220> cebador
 <223> UpstreamSpelSmu
 <400> 14
 10 gagtaccggt gtctgggtca c 21
 <210> 15
 <211> 23
 <212> DNA
 15 <213> Artificial
 <220> cebador
 <223> SacI-3'Imu
 20 <400> 15
 gagctctatg attattggtt aac 23
 <210> 16
 <211> 22
 25 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220> cebador
 <223> NeoI
 30 <400> 16
 gcatgatctg gacgaagagc at 22
 <210> 17
 <211> 22
 35 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220> cebador
 40 <223> Neo2
 <400> 17
 tcccctcaga agaactcgtc aa 22
 45

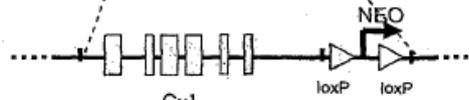
REIVINDICACIONES

- 5 1. Ratón transgénico caracterizado por que comprende un locus de IgH modificado por el reemplazo de la secuencia de conmutación $S\mu$ por todo o parte de un transgén constituido por el gen $C\mu$ de una inmunoglobulina humana de clase G, incluyendo al menos el exón codificante del dominio CH3 y los exones de membrana m1 y m2, y por que produce anticuerpos que son mayoritariamente IgG quiméricas cuyos dominios constantes de cadenas pesadas son de origen humano.
2. Ratón transgénico según la reivindicación 1, caracterizado por que es homocigótico de dicho locus de IgH modificado.
- 10 3. Ratón transgénico según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado por que dicho locus de IgH está modificado mediante reemplazo de la secuencia de conmutación $S\mu$ por la totalidad del gen $C\gamma$.
4. Ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicho gen $C\gamma$ es el gen $C\gamma 1$.
5. Ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que comprende otro transgén que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina humana.
- 15 6. Ratón transgénico según la reivindicación 5, caracterizado por que dicho transgén es un gen kappa humano.
7. Ratón transgénico según la reivindicación 6, caracterizado por que dicho gen kappa humano presenta la secuencia SEQ ID NO: 9.
- 20 8. Ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado por que es homocigótico o heterocigótico de dicho transgén.
9. Ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, caracterizado por que posee un locus endógeno de la cadena kappa inactivado.
- 25 10. Vector de orientación de la recombinación homóloga caracterizado por que comprende el gen $C\gamma$ de una inmunoglobulina humana de clase G o un segmento de este gen que incluye al menos el exón codificante del dominio CH3 y los exones de membrana m1 y m2, tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, flanqueado por fragmentos de secuencias del locus de IgH de múrido que son adyacentes de la secuencia $S\mu$.
11. Vector de orientación según la reivindicación 10, caracterizado por que dichos fragmentos de secuencias flanqueantes que son adyacentes de la secuencia $S\mu$ son secuencias de múrido de SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente en 5' y en 3'.
- 30 12. Célula embrionaria de ratón, modificada por un vector de orientación según la reivindicación 10 o la reivindicación 11.
- 35 13. Anticuerpo quimérico de clase IgG susceptible de obtenerse a partir de linfocitos B de un ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 o el fragmento Fab, Fab'2 o Fe de dicho anticuerpo, caracterizado por que dicho anticuerpo comprende una cadena pesada quimérica cuyos dominios constantes son de origen humano y los dominios variables son de origen múrido y cadenas ligeras humanas cuyos dominios variables están codificados por $V\kappa 1$ - $J\kappa 5$.
- 40 14. Reactivo de diagnóstico caracterizado por que comprende un anticuerpo quimérico de clase IgG o un fragmento de este anticuerpo según la reivindicación 13.
15. Composición farmacéutica caracterizada por que comprende al menos un anticuerpo quimérico de clase IgG o un fragmento de este anticuerpo según la reivindicación 13.

Locus de IgH de murido orientado



Construcción de Iγ1 humana



Recombinación homóloga

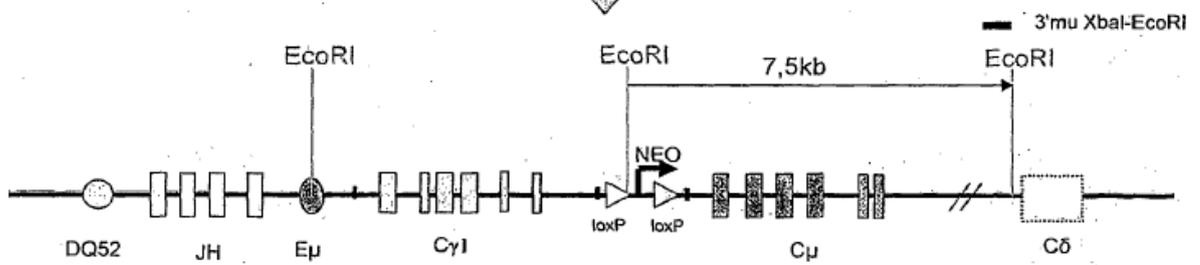


FIGURA 1

```

gacagttaag aaccocagggg cctctgcecc atgcccgt gagcccagac actggacgct gaacctcgcg
acctctcttg cagcctocac caagggooca ctgggcccag ctctgtccca cacocgggtc acatggcacc
ggggoacagc agccttgggc tgootggtea aggaactactt ccoctggcacc ctctccaag agcacctctg
aggogocctg accagcggcg tgcaacactt ccccgactctt ccccgaaocg gtgacgggtg cgtggaactc
agogtgggtga oogtgcoctc cagcagottg ggaaccaga octacatctg caacgtgat caccocccagc
gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgggtg agaggccagc acagggaggg aggggtgtctg ctggaagcca
ggctcagcgc tcoctgcoctg acgcacoccg gctatgcagc cccagtcocag ggcagcaagg caggccccgt
ctgcctcttc acccggaggc ctctgcccgc cccactcatg ctacaggaga gggctctctg gctttttccc
caggctctgg gcaggcacag gctagggtgcc cetaaccag gccctgcaca caaaggggca ggtgctgggc
tcagacctgc caagagccat atccgggagg acctgccc tgacctaac ccacccaaa ggccaaaactc
tccactccct cagctcggac acctctctc ctccagatt ccagtaact ccaatctct ctctgcagag
cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtcc caggtaagcc agccocaggc tcgocctcca
gctcaaggcg ggacagggtc cctagagtag cctgcaccca gggacaggcc ccagccgggt gctgacactg
ccacctccat ctcttccca gcacctgaac tcoctggggg accgtcagtc tctctcttc ccccaaaacc
caaggacacc ctoatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgogtgggtg tggacgtgag ccacgaagac
cctgagggtca agttcaactg gtaoctggac ggogtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgocggagg
agcagtaaaa cagcagctac cgtgtggtea gogtctcac ogtcoctgac caggactggc tgaatggcaa
ggagtacaag tgcaaggctt ccaacaaaagc cctcccagcc cccatogaga aaacctctc caaagccaaa
ggtgggaccc gtgggggtgc agggccacat ggacagaggc cggctcggcc caccctctg cctgagagtg
accgctgtac caacctctgt cctacaggg cagcccaggt aaccacaggt gtacacctc ccccatccc
gggatgagct gaocaaagac caggtcagoc tgacctgoc ggtocaaaggc ttctatocca ggcactcgc
cgtggagtg ggagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccaogc ctoocgtgt ctocccgac
ggctcctctt tcoctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaaac gtctctcat
gctcogtgat goatgaggct ctgcacaaa actacacaca gaagagocct tcoctgtct cgggtaaaatg
agtgccacgg cgggcaagcc cccgtcccc aggtctctg ggtcgcgga ggatgcttg cacgtacccc
gtgtacatac ttoocaggca cccagcattg aataaaagca cccagcgtt cctgggccc ctgcgagact
gtgatgggtc tttccacggg tcaggccgag tctgaggcct gactggcat agggaggcag agtgggtccc
actgtcccca cactggccca ggctgtgcag gtgtgcoctg gccgcctagg gtggggctca gccaggggt
gccctcggca ggggtgggga tttgccagcg tggocctccc tccagcagca gctgcoctgg gctgggccac
gagaagccct agggagccct ggggacagac acacagccc tgcoctctgta ggagactgc ctgtctctg
agcgcctct cctccgacc gcatgcccac tccggggccat gcoctagtcca tgtgcgtagc gacagccct
cctcaccaca tetaccccca cggcactaac cctgggcagc ootgcccagc ctgcacocg catggggaca
caaccgactc cggggacatg cactctcggg cctgtggag agactggtcc agatgccac acacacactc
agcccagacc cgttcaacaa acccgcact gagggtggcc ggccacacgg ccaccaaca cacacgtgca
cgctcaccac acggagcctc acccgggcca accgcacagc acccagacca gagcaaggte ctgcacacg
tgaacactcc tcggacacag gccccacga gccccacog gcacctcaag gcccacgagc cgctcggcag
ctctccaca tgctgacctg ctcagacaaa cccagccctc ctotcacaag gtgcccctgc agccgccaca
cacacacagg ggatcacaca ccacgtcacg tccctggccc tggcccactt cccagtgcg ccttccctg
cagctgggggt cacatgagggt gtgggcttca ccatcctcct gccctctggg cctcagggag ggacacggga
gacggggagc gggctcctgct gagggccagg togotatcta gggcgggtg tetggctgag ccccggggc
aaagctgggt cccagggcgg gcagctgtgg gtaggtgacc tcaggacatt gttggccat cccggccgg
cctacatcc tgggtcctgc cacagggga atcaccocca gaggcccaag cccaggggga cacagcactg
accacccct tcoctgtccag agctgcaact ggaggagagc tgtgcccagg cgcaggaocg ggagctggac
gggtgtgga cgaccatcac catcttcatc acaactctcc tgtaagcgt gtgtacagt gccaccgtca
ccttctcaa ggtcggccgc acgttgtccc cagctgtcct tgacattgtc ccccatgctg tcaaaactg
tctctgacac tgtcccacag gctgtcccca cctgtcoctg acgetgtccc ccatgetctc acaactgtc
cctgacattg tcccaatgc tgccccacc tgtccaacag tgtccccag gctctccca catgtccccg
acactgtccc ccatgtgtc cccatctgtc ccaacactg tccccaccc tgtccccctt cctgacacca
actgtcccc acagttcca cctgtccctg acactgtccc ccatgtctc ctacagtacc tggcactgtc
tccccactc tgtccctat agttcctggc cctgtcccc acgetgtccc gctgtccca ccaatatccc
ccccatgctg tccctcctg tatgaaaccc tgtcccacat gctgtccca cctgtccctg acttctccc
ccacactgtc cccactgtc cccgacactc tctccacgt tctcttacc taacccogac acttctccc
atgtgtccc caccatctc cgacactgta cccaactgtg tccccactg tctcaacac tgtccccat
gtgtcccca cactctcct acactctcct cccactgtc cccactgtc cctgatattg tccccatg
agtctccacc tgtcccaat getgtcccc aggetgtacc taccagtaca aactgtccc ccatgtgtc
cccactgtc cctgacactg tccccacgc tgtcccctc tgtccccgac actgtcccc acactgtccc
cacctgtccc caacactat ctccatgctg tcccctctg tccccactg tcccctaac tgtccccat

```

FIGURA 2

```

gctgtcccca ccagtcccca aaactttcct ccacactgtc cccacctgtc cccaacactg tcccccaagc
tatccccct gtccccgaca atgtccccac tgtttcctcc tgttccctcc tatccctgac actgtccgcc
atgtgtccc cacctgtccc tgacactgtc tcccactctg tcccctataa tccctgacac tgtccccac
gccgtccct cccgtatgca ccactgtccc ccaagetgtc cccacctgtc ctcaacacag tcccccatgc
tgtccccacc tgtccccaac actctcctcc atgtccccac ctgtccctga tattgtcccc catgcagtcc
ccacctgtcc ccgatgtgt cccccgggt gtacctacca gtccaacact gtccccaca ctctccccac
ctgtccctga tactgtcccc catgtgtgcc ccacctgtcc cggacactgt tctccacgt ctccccctct
gtccctgaca ctgtccccca cactgtcccc acctgtcccc aacactatcc tccatcctgt cccaacctgt
ctctacact gtcccccatg ctgtccccac cagtccccaa cactgtctc catgtgtcc cctctatcc
caacactgtc ccccatgcta tetcccctgt cctgacaat gtccccactg tttcctgtcc cctctatcc
ctgacactgt ccccatgct gtccccactg ctgacactgt cccccacac gccctcctga cactgtctcc
cactgtccc cctataatcc ctgacactgt tccacacagt ccccacctct gtatgacca ctgtccccca
tgtgtcccc acctgtccct gatgtgtgcc tccacacagt ccccacctct cctgacact gtccccatct
ctccccaa ca ctctcctcca tgtgtcctt aactgtcccc aacactctc cacactctgt ctccacctgt
ccctgacact gtccccaca ctgtctcac ctgtgtetga cactgtcccc cacgctgtcc ccacctgtcc
ctgacgtgt ctctgtgtgt gtccacatgc tgttgggtgcc ctggctctgc tctctatcac caagcctcag
agcaggcagt ggtgaggcca tggcacctgg gtggcatgag gggccggatg ggcctcaggg gcagggtgt
ggcctgctg gactgacggg tgggtgggcc ttgggggag agaggtggcc tcagtgccct gaggggtggg
tggggtctgg gggcagggt gtggcctgc tcacctctgt gctgtgctt gcctacaggt gaagtggatc
ttctcctcgg tgggtggacct gaagcagacc atcactcccc actacaggaa catgatogga caggggct
agggccaccc tetgccccgt gtccagggcc gccagacc cccatgact ccatggcca tgcagcca
ccacccaggc cacacctgcc cccgacctca cgcctcaa tccagacc tgtgcatagc aggtctacc
tctgacctg acacacctga cacgcccc tccagacc tgtgcatagc aggtctacc
ctgcttggg catgcagggc actgggggcc aggtgtcccc tcagcaggac gtcttgccc
aaggtgtca cacaaaagga ggcagtgacc ggtatccag gccccaccc aggcaggacc
gccaaccccg tccacgccag cctcctgaac acaggcgtgg tttccagatg gtgagtggga
ccaaggtagg gaagccacag caccatcagg cctgttggg gaggcttccg agagctgcca
agacggcctt cctcccagcc cgcagccagc cagcctccat tccgggact cccgtgaact
ggaatgaggt tgttctgatt tcaagcaaag aacgtgtctc tctggctcct ggaacagtc
caccaccct tggctgctg cccacactgc tggattctcg ggtggaactg gaccgcagg
cccagagtcc gcactgggga gagaaggggc caggcccagg aactgccac ctcccacca
ccgagatcac tcagagaaga gcctgggcca tgtggcgt gcaggagccc cacagtcaa
agcccaagga aggctgggc atctgccag acaggcctcc cagagaaggo tggtgaccag
ggcaagactc agccttggg gggcctgagg acagaggagg cccaggagca tcggggagag
acaccgggag agccaggagc gtggacacag ccagaactca tcacagaggc tggcgtccag
cgtgcagcag gaacaagcag ccactctggg ggcaccaggt ggagaggcaa gacgacaaag
tgttcttggc aaagcagggc tgetggccac gagtctgga cagaggcccc cacgtctgc
acgccgttcc gtgactgtca cgcagaatct gcagacagga agggagactc gagcgggagt
cctgcctcgg ccgtcaggga ggaactcctgg gctcactoga aggaggtgcc accatttcag
ttttcttctt cttttaaatt ttctaaagct cattaattgt cttttagtga tcttttgtga
atatccttt taagtcttgt actctgtgat gggagc

```

FIGURA 2 (continuación)

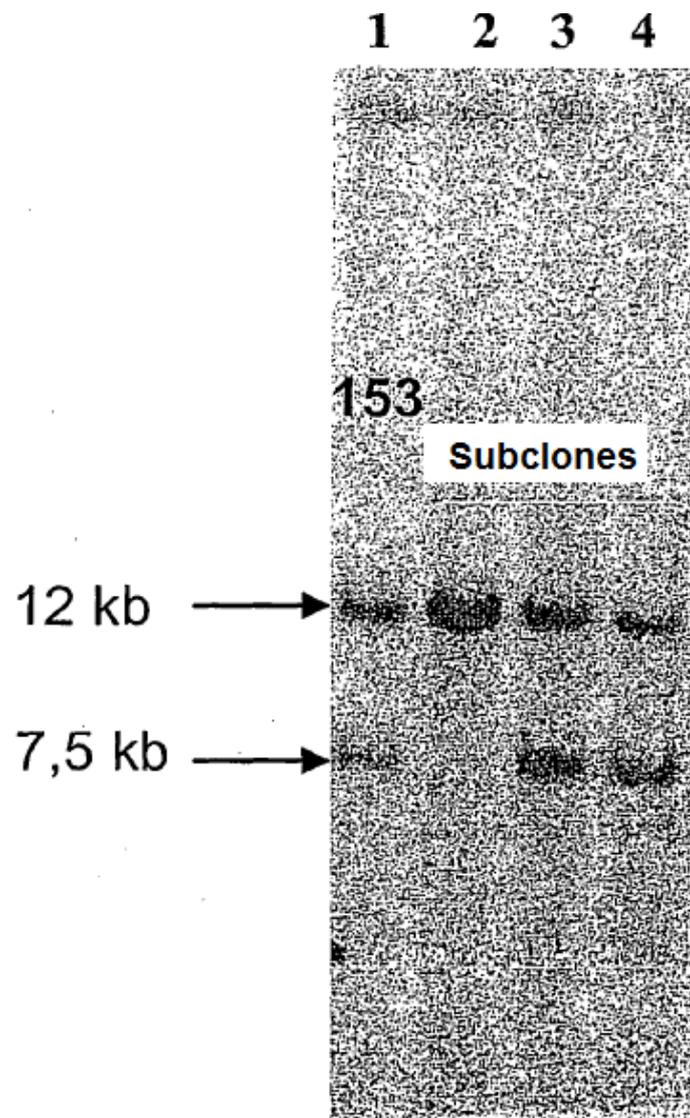


FIGURA 3

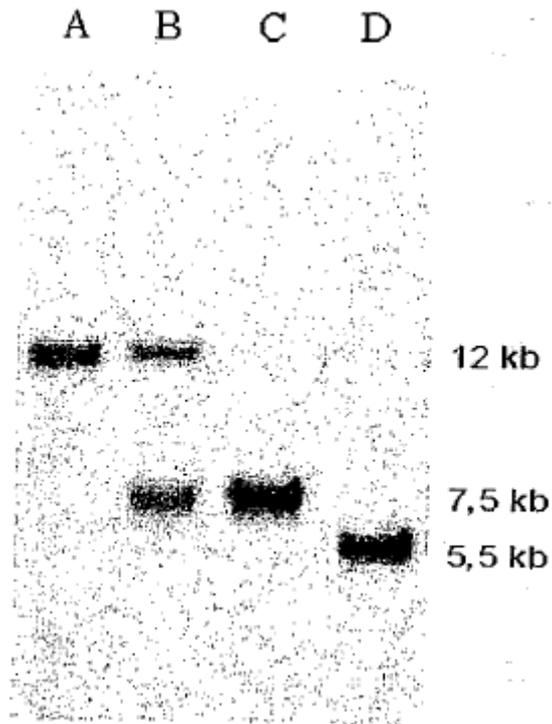


FIGURA 4

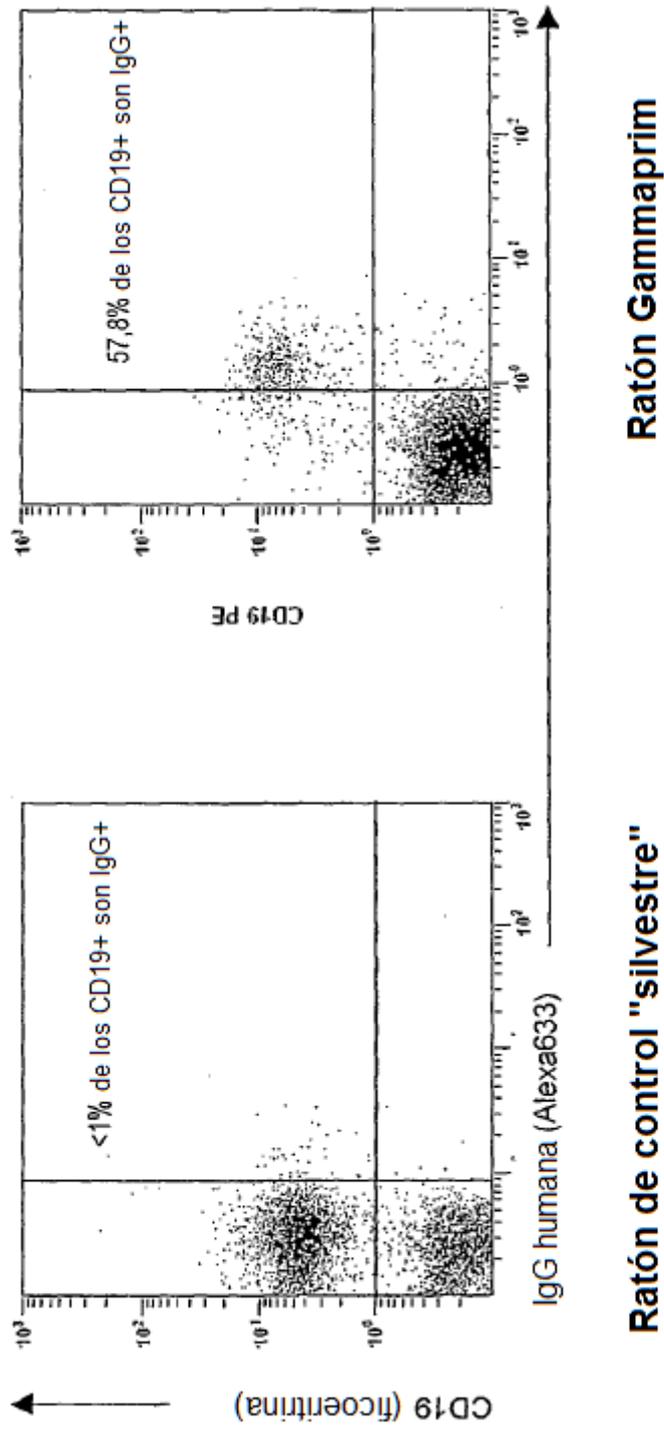


FIGURA 5

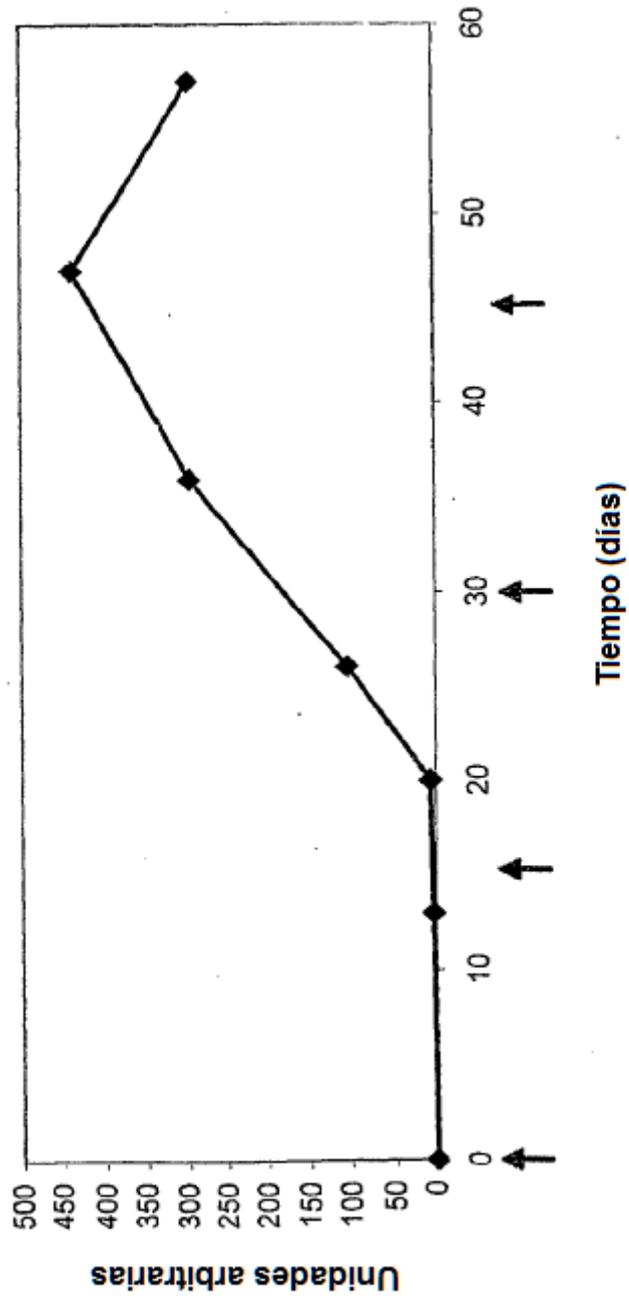


FIGURA 6