

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 928**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A01K 67/027 (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: **22.06.2011 E 12195716 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2568049**

54 Título: **Ratones que expresan una cadena ligera con las regiones variable lambda humana y constante de ratón**

30 Prioridad:

22.06.2010 US 357314 P
22.06.2010 US 357317 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.07.2016

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

MACDONALD, LYNN;
STEVENS, SEAN;
GURER, CAGAN;
MURPHY, ANDREW J. y
HOSIAWA, KAROLINA A.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 576 928 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 que expresan una cadena ligera con las regiones variable lambda humana y constante de ratón

5 Campo

Los ratones modificados genéticamente que comprenden un segmento génico variable de cadena ligera de inmunoglobulina λ humana no reordenado ($hV\lambda$) y un segmento génico de unión λ humano ($hJ\lambda$) unidos de forma funcional con una región constante de cadena ligera lambda de ratón intacta ($C\lambda$). Los ratones modificados genéticamente que expresan anticuerpos que comprenden una cadena ligera de inmunoglobulina derivada de un gen $hV\lambda$, uno $hJ\lambda$ y uno $C\lambda$ de ratón.

Antecedentes

15 Los ratones que expresan anticuerpos que son completamente humanos, o parcialmente humanos y parcialmente de ratón, son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se ha informado de ratones transgénicos que expresan anticuerpos completamente humanos a partir de transgenes que contienen genes de la región variable de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada humana. Los ratones modificados genéticamente que comprenden un
20 remplazo de los segmentos génicos de la región variable de cadena pesada de ratón endógenos (HCVR) y segmentos génicos de la región variable de cadena ligera kappa (κ) (LCVR) con segmentos génicos HCVR y LCVR humanos y que componen anticuerpos quiméricos con una cadena kappa quimérica humana/de ratón también son conocidos.

25 Las cadenas ligeras de anticuerpo están codificadas por uno de dos loci separados: kappa (κ) y lambda (λ). Las cadenas ligeras de anticuerpo de ratón son principalmente del tipo κ . La relación de uso de cadena ligera κ a λ en seres humanos es de aproximadamente 60:40, mientras que en ratones es de aproximadamente 95:5. El uso sesgado de cadenas ligeras κ en ratones está supuestamente sostenido en ratones modificados genéticamente capaces de expresar anticuerpos completa o parcialmente humanos. Por tanto, los ratones que expresan anticuerpos completa o parcialmente humanos parecen estar restringidos en el uso de regiones variables lambda.

30 Existe una necesidad en la técnica de generar regiones variables lambda, sean de ratón o humanas, para su uso en la preparación de proteínas de unión a epítipo. Existe una necesidad en la técnica de ratones que expresen anticuerpos completa o parcialmente humanos, donde los ratones presenten un uso aumentado de región variable λ ($V\lambda$).

35 Existe una necesidad de la técnica de ratones que expresen anticuerpos completa o parcialmente humanos, donde los ratones presenten un uso aumentado de región variable lambda ($V\lambda$). El documento WO 00/26373 se refiere a la expresión murina del locus λ de Ig humana.

40 El documento WO 2010/039900 se refiere a células no humanas knock-in y mamíferos que tengan un genoma que codifique cadenas Ig quiméricas y anticuerpos y métodos para producir dichas células y mamíferos knock-in. Se describe un ratón knock-in que tiene un genoma que comprende un segmento VH humano, un segmento génico JH humano y un segmento génico DH humano y una parte de un locus de cadena pesada de Ig singénica, donde el locus de cadena pesada humana reemplaza todo o parte de un locus de cadena pesada endógeno de modo que el
45 animal es capaz de producir cadenas pesadas quiméricas. En realizaciones específicas, el genoma de ratón comprende adicionalmente un locus de cadena ligera de IgA humana, o una parte del mismo, y un 3'LCR de $Ig\lambda$, donde el locus de cadena ligera de $Ig\lambda$ humana reemplaza todo o parte de un locus de cadena ligera de Ig endógeno.

Sumario

50 La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes. Se describen ratones modificados genéticamente, embriones, células, tejidos, así como construcciones de ácido nucleico para modificar ratones, y métodos y composiciones para prepararlos y usarlos. Los ratones y las células que generan regiones variables λ humanas en el contexto de una cadena ligera λ , a partir de un locus de cadena ligera de ratón endógeno, también se proporciona como se indica en las reivindicaciones. También se describen métodos para preparar anticuerpos que comprenden regiones variables lambda. También se describen métodos para seleccionar cadenas pesadas que se expresan con regiones variables lambda afines.

60 Se describen proteínas de unión a antígeno quiméricas y humanas (por ejemplo, anticuerpos), y ácidos nucleicos que las codifican, que comprenden regiones variables mutadas somáticamente, incluyendo anticuerpos que tienen cadenas ligeras que comprenden un dominio variable derivado de un segmento génico $V\lambda$ humano y uno $J\lambda$ humano fusionados a un dominio constante de cadena ligera lambda de ratón.

65 La presente invención proporciona un ratón que comprende:

(a) un remplazo de uno o más segmentos génicos variable (V_H), de diversidad (D_H) y de unión (J_H) de cadena pesada con uno o más segmentos génicos V_H , D_H , y J_H humanos en un locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón endógeno; y

5 (b) un alelo de cadena ligera λ (lambda) endógeno que comprende un segmento génico variable lambda humano no reordenado ($hV\lambda$) y uno de unión lambda humano no reordenado ($hJ\lambda$),

10 donde el ratón comprende una delección de un primer grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo de cadena ligera λ de ratón endógeno y el remplazo, en su totalidad o en parte, de los segmentos génicos $V\lambda$ - $J\lambda$ del segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo con dichos segmentos génicos $V\lambda$ y $J\lambda$ humanos que están unidos de forma funcional a un gen de la región constante lambda ($C\lambda$) de ratón intacto de dicho segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$, de modo que el ratón expresa una cadena ligera derivada de un gen $hV\lambda$, uno $hJ\lambda$ y uno $C\lambda$ de ratón, donde los potenciadores endógenos Enh 2.4, el potenciador 3' lambda de ratón (Enh) y Enh 3.1 se mantienen intactos en dicho alelo de cadena ligera λ .

15 La invención proporciona adicionalmente:

20 una célula aislada que expresa una cadena ligera derivada de un gen $hV\lambda$, uno $hJ\lambda$ y uno $C\lambda$ de ratón, donde la célula es de, o se puede obtener de, el ratón de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y donde la célula comprende: (a) un remplazo de uno o más segmentos génicos variable (V_H), de diversidad (D_H) y de unión (J_H) de cadena pesada con uno o más segmentos génicos V_H , D_H , y J_H humanos en un locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón endógeno; y (b) un alelo de cadena ligera λ (lambda) endógeno que comprende un segmento génico variable lambda humano no reordenado ($hV\lambda$) y uno de unión lambda humano no reordenado ($hJ\lambda$), y una delección de un primer grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo de cadena ligera λ de ratón endógeno y remplazo, en su totalidad o en parte, de los segmentos génicos $V\lambda$ - $J\lambda$ del segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo con dichos segmentos génicos $V\lambda$ y $J\lambda$ humanos que están unidos de forma funcional a un gen de región constante $C\lambda$ de ratón intacto de dicho segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$, y donde los potenciadores endógenos Enh 2.4, el potenciador 3' lambda de ratón (Enh) y Enh 3.1 se mantienen intactos en dicho alelo de cadena ligera λ ;

30 una célula madre embrionaria (ES) de ratón aislada que comprende: (a) un remplazo de uno o más segmentos génicos variable (V_H), de diversidad (D_H) y de unión (J_H) de cadena pesada con uno o más segmentos génicos V_H , D_H , y J_H humanos en un locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón endógeno; y (b) un alelo de cadena ligera λ (lambda) endógeno que comprende un segmento génico variable lambda humano no reordenado ($hV\lambda$) y uno de unión lambda humano no reordenado ($hJ\lambda$), y una delección de un primer grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo de cadena ligera λ de ratón endógeno y un remplazo, en su totalidad o en parte, de los segmentos génicos $V\lambda$ - $J\lambda$ del segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo con dichos segmentos génicos $V\lambda$ y $J\lambda$ humanos que están unidos de forma funcional a un gen de región constante $C\lambda$ de ratón intacto de dicho segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$, donde los potenciadores endógenos Enh 2.4, potenciador 3' lambda de ratón (Enh) y Enh 3.1 se mantienen intactos en dicho alelo de cadena ligera λ ;

45 un embrión de ratón que comprende, se ha preparado a partir de, o se puede obtener de, la célula ES de ratón de la invención, donde el embrión de ratón comprende: (a) un remplazo de uno o más segmentos génicos variable (V_H), de diversidad (D_H) y de unión (J_H) de cadena pesada con uno o más segmentos génicos V_H , D_H , y J_H humanos en un locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón endógeno; y (b) un alelo de cadena ligera λ (lambda) endógeno que comprende un segmento génico variable lambda humano no reordenado ($hV\lambda$) y uno de unión lambda humano no reordenado ($hJ\lambda$), y una delección de un primer grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo de cadena ligera λ de ratón endógeno y un remplazo, en su totalidad o en parte de los segmentos génicos $V\lambda$ - $J\lambda$ del segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo con dichos segmentos génicos $V\lambda$ y $J\lambda$ humanos que están unidos de forma funcional a un gen de la región constante $C\lambda$ de ratón intacto de dicho segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$, donde los potenciadores endógenos Enh 2.4, potenciador 3' lambda de ratón (Enh) y Enh 3.1 se mantienen intactos en dicho alelo de cadena ligera λ ;

55 un hibridoma que expresa una cadena ligera derivada de un gen $hV\lambda$, uno $hJ\lambda$ y uno $C\lambda$ de ratón donde el hibridoma es de, se puede obtener de, el ratón de la invención, donde la célula comprende: (a) un remplazo de uno o más segmentos génicos variable (V_H), de diversidad (D_H) y de unión (J_H) de cadena pesada con uno o más segmentos génicos V_H , D_H , y J_H humanos en un locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón endógeno; y (b) un alelo de cadena ligera λ (lambda) endógeno que comprende un segmento génico variable lambda humano no reordenado ($hV\lambda$) y uno de unión lambda humano no reordenado ($hJ\lambda$), y una delección de un primer grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo de cadena ligera λ de ratón endógeno y remplazo, en su totalidad o en parte, de los segmentos génicos $V\lambda$ - $J\lambda$ de dicho segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ del alelo con dichos segmentos génicos $V\lambda$ y $J\lambda$ humanos que están unidos de forma funcional a un gen de región constante $C\lambda$ de ratón intacto de dicho segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$, y donde los potenciadores endógenos Enh 2.4, potenciador 3' lambda de ratón (Enh) y Enh 3.1 se mantienen intactos en dicho alelo de cadena ligera λ ; y

65

uso de la célula B de la invención para preparar un hibridoma que expresa una cadena ligera derivada de un gen hVλ, uno hJλ y uno Cλ de ratón, donde el hibridoma es de, se puede obtener de, el ratón de la invención, donde la célula comprende: (a) un remplazo de uno o más segmentos génicos variable (V_H), de diversidad (D_H) y de unión (J_H) de cadena pesada con uno o más segmentos génicos V_H, D_H, y J_H humanos en un locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón endógeno; y (b) un alelo de cadena ligera λ (lambda) endógeno que comprende un segmento génico variable lambda humano no reordenado (hVλ) y uno de unión lambda humano no reordenado (hJλ), y una delección del primer grupo génico Vλ-Jλ-Cλ de dicho alelo de cadena ligera λ de ratón endógeno y remplazo, en su totalidad o en parte, de los segmentos génicos Vλ-Jλ del segundo grupo génico Vλ-Jλ-Cλ de dicho alelo con dichos segmentos génicos Vλ y Jλ humanos que están unidos de forma funcional a un gen de la región constante Cλ de ratón intacto de dicho segundo grupo génico Vλ-Jλ-Cλ y donde los potenciadores endógenos Enh 2.4, potenciador 3' lambda de ratón (Enh) y Enh 3.1 se mantienen intactos en dicho alelo de cadena ligera λ.

La presente invención proporciona adicionalmente un método de preparación de un anticuerpo en un ratón que comprende: (a) exponer un ratón de la invención a un antígeno; (b) permitir que el ratón desarrolle una respuesta inmunitaria al antígeno; y (c) aislar del ratón de (b) un anticuerpo que reconozca específicamente el antígeno, o aislar del ratón de (b) una célula que comprende un dominio de inmunoglobulina que reconoce específicamente el antígeno, o identificar en el ratón de (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o ligera que se une al antígeno, donde el anticuerpo comprende una cadena ligera derivada de un gen hVλ, uno hJλ o uno Cλ de ratón.

Se describen anticuerpos que comprenden (a) un dominio variable de cadena pesada humana (hV_H) fusionado a una región constante de cadena pesada de ratón, y (b) un Vλ humano fusionado a un dominio C_L de ratón; donde uno o más de los dominios variables se mutan somáticamente, por ejemplo, durante selección de anticuerpos o células inmunitarias en un ratón de la invención. El hVλ no reordenado y hJλ no reordenado están unidos de forma funcional a una región constante λ (Cλ) de ratón intacta.

También se describe un ratón que comprende en su línea germinal, en un locus de cadena ligera de ratón endógeno, una secuencia de región variable de cadena ligera λ humana, donde la secuencia de región variable lambda humana se expresa en una cadena ligera que comprende una secuencia génica de región constante lambda de inmunoglobulina de ratón.

El locus de cadena ligera de ratón endógeno es un locus λ.

En un aspecto, el ratón carece de una secuencia variable de cadena ligera endógena en el locus de cadena ligera de ratón endógeno.

En un aspecto, todos o sustancialmente todos los segmentos génicos de la región variable de cadena ligera de ratón endógenos se remplazan con uno o más segmentos génicos de región variable λ humana.

La secuencia de región variable de cadena ligera λ humana comprende una secuencia Jλ humana. En un aspecto, la secuencia Jλ humana se selecciona del grupo que consiste en Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ7, y una combinación de los mismos.

En un aspecto, la secuencia de región variable de cadena ligera λ humana comprende un fragmento del grupo A del locus de cadena ligera humana. En un aspecto específico, el fragmento del grupo A del locus de cadena ligera λ humana se extiende desde hVλ3-27 hasta hVλ3-1.

En un aspecto, la secuencia de región variable de cadena ligera λ humana comprende un fragmento del grupo B del locus de cadena ligera humana. En un aspecto específico, el fragmento del grupo B del locus de cadena ligera λ humana se extiende desde hVλ5-52 hasta hVλ1-40.

En un aspecto, la secuencia de región variable de cadena ligera λ humana comprende un fragmento genómico del grupo A y un fragmento genómico del grupo B. En un aspecto, la secuencia de región variable de cadena ligera λ humana comprende al menos un segmento génico del grupo A y al menos un segmento génico del grupo B.

En un aspecto, más del 10 % del repertorio virgen de cadena ligera del ratón se obtiene de al menos dos segmentos génicos hVλ seleccionados de 2-8, 2-23, 1-40, 5-45, y 9-49. En un aspecto, más del 20 % del repertorio virgen de cadena ligera del ratón se obtiene de al menos tres segmentos génicos hVλ seleccionados de 2-8, 2-23, 1-40, 5-45, y 9-49. En un aspecto, más del 30 % del repertorio virgen de cadena ligera del ratón se obtiene de al menos cuatro segmentos génicos hVλ seleccionados de 2-8, 2-23, 1-40, 5-45, y 9-49.

También se describe un ratón modificado genéticamente, donde el ratón comprende un segmento génico Vλ y uno Jλ de inmunoglobulina no reordenado unido de forma funcional a un locus de cadena ligera de ratón que comprende un gen Cλ de ratón intacto.

Los segmentos génicos V λ y J λ son segmentos génicos humanos.

El locus de cadena ligera de ratón endógeno es un locus de cadena ligera λ .

5 El ratón comprende adicionalmente un remplazo de uno o más segmentos génicos V, D y/o J de cadena pesada con uno o más segmentos génicos V, D y/o J humanos en un locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón endógeno.

10 En un aspecto, el ratón comprende un segmento génico variable de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana no reordenado (V λ) y un segmento génico de unión λ (J λ) en un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno que comprende un gen C λ de ratón intacto.

15 El locus génico variable de cadena ligera λ (el "locus λ ") comprende al menos un segmento génico hV λ y al menos un segmento génico J λ humano (hJ λ). En otro aspecto, el locus λ comprende hasta cuatro segmentos génicos hJ λ .

20 En un aspecto, el locus V λ comprende una pluralidad de hV λ . En un aspecto, la pluralidad de hV λ se selecciona de modo que provoque la expresión de un repertorio de región variable de cadena ligera λ que refleje aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, o aproximadamente el 90 %, o más del uso de V λ observado en un ser humano. En un aspecto, el locus V λ comprende segmentos génicos hV λ 1-40, 1-44, 2-8, 2-14, 3-21, y una combinación de los mismos.

25 En un aspecto, los hV λ incluyen 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, y 3-12. En un aspecto específico, el locus V λ comprende una secuencia contigua del locus de cadena ligera λ humana que abarca desde V λ 3-12 a V λ 3-1. En un aspecto, el locus V λ comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 hV λ . En un aspecto específico, las hV λ incluyen 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, y 3-12. En un aspecto específico el locus V λ comprende una secuencia contigua del locus λ humano que abarca desde V λ 3-12 a V λ 3-1. En un aspecto específico, el locus κ endógeno está deletado en parte o completamente.

30 En un aspecto, el locus V λ comprende de 13 a 28 o más hV λ . En un aspecto específico, los hV λ incluyen 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, y 3-27. En un aspecto específico el locus κ endógenos está deletado en parte o completamente.

35 En un aspecto, el locus V λ comprende de 29 a 40 hV λ . En una realización específica, toda o sustancialmente toda la secuencia entre hV λ 1-40 y hV λ 3-29 en el ratón modificado genéticamente consiste esencialmente en una secuencia λ humana de aproximadamente 959 pb encontrada en la naturaleza (por ejemplo, en la población humana) cadena abajo del segmento génico hV λ 1-40 (cadena abajo de la parte no traducida 3'), a un sitio de enzima de restricción (por ejemplo, P1-SceI), seguido por una secuencia λ humana de aproximadamente 3.431 pb cadena arriba del segmento génico hV λ 3-29 encontrado en la naturaleza. En un aspecto específico, el locus κ de ratón endógeno está deletado en parte o completamente.

45 El locus V λ comprende al menos un hJ λ . En un aspecto, el locus V λ comprende una pluralidad de hJ λ . En un aspecto, el locus V λ comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, o 7 hJ λ . En un aspecto específico, el locus V λ comprende cuatro hJ λ . En un aspecto específico, los cuatro hJ λ son hJ λ 1, hJ λ 2, hJ λ 3, y hJ λ 7. En un aspecto, el locus V λ comprende un hJ λ . En un aspecto específico, el un hJ λ , es hJ λ 1. En un aspecto específico, el locus κ endógeno está deletado en parte o completamente.

50 El locus V λ comprende al menos un, hV λ , al menos un hJ λ , y un gen C λ de ratón intacto. En un aspecto específico, el gen C λ de ratón intacto es C λ 2.

55 En un aspecto, el ratón comprende un remplazo de los segmentos génicos V λ de ratón endógenos en el locus λ de ratón endógeno con uno o más segmentos génicos V λ humanos en el locus λ de ratón endógeno, donde los segmentos génicos hV λ están unidos de forma funcional a un gen de la región C λ de ratón intacto, de modo que el ratón reordene los segmentos génicos hV λ y exprese una cadena ligera de inmunoglobulina quimérica inversa que comprenda un dominio hV λ y un C λ de ratón. En un aspecto específico, el gen C λ de ratón intacto es C λ 2. En un aspecto, el 90-100 % de los segmentos génicos V λ de ratón no reordenados se remplazan con al menos un segmento génico hV λ no reordenado. En un aspecto específico, todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V λ de ratón endógenos se remplazan con al menos un segmento génico hV λ no reordenado. En un aspecto, el remplazo es con al menos 12, al menos 28, o al menos 40 segmentos génicos hV λ no reordenados. En una realización, el remplazo es con al menos 7 segmentos génicos hV λ no reordenados funcionales, al menos 16 segmentos génicos hV λ no reordenados funcionales, o al menos 27 segmentos génicos hV λ no reordenados funcionales. En una realización, el ratón comprende un remplazo de todos los segmentos génicos J λ de ratón con al menos un segmento génico hJ λ no reordenado. En un aspecto, el al menos un segmento génico hJ λ no reordenado se selecciona de J λ 1, J λ 2, J λ 3, J λ 4, J λ 5, J λ 6, J λ 7, y una combinación de los mismos. En una realización específica el uno o más segmentos génicos hV λ se seleccionan de un segmento génico hV λ 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, 3-12, 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, 3-27, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 5-48, 9-49, 1-50, 1-51, 5-52, y

una combinación de los mismos. En un aspecto específico, el al menos un segmento génico hJ λ no reordenado se selecciona de J λ 1, J λ 2, J λ 3, J λ 7, y una combinación de los mismos.

5 También se describe un ratón modificado genéticamente, donde el ratón comprende no más de dos alelos de cadena ligera, donde los alelos de cadena ligera comprenden (a) un segmento génico V λ y uno J λ humano de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera de ratón endógeno que comprende un gen C λ de ratón intacto; y, (b) un segmento génico V λ y uno J λ de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera de ratón endógeno que comprende un gen C λ de ratón.

10 En un aspecto, el locus de cadena ligera de ratón endógeno es un locus κ . En otro aspecto, el locus de cadena ligera de ratón endógeno es un locus λ .

En un aspecto, los no más de dos alelos de cadena ligera se seleccionan entre un alelo κ y un alelo λ , y dos alelos λ . En un aspecto específico, uno de los dos alelos de cadena ligera es un alelo λ que comprende un gen C λ 2 intacto.

15 En un aspecto, el ratón comprende un locus de cadena ligera de inmunoglobulina funcional y un locus de cadena ligera no funcional, donde el locus de cadena ligera funcional comprende un segmento génico V λ y uno J λ humano de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno que comprende un gen C λ de ratón intacto. En un aspecto, el gen C λ intacto es C λ 2.

20 En un aspecto, el ratón comprende adicionalmente al menos un alelo de cadena pesada de inmunoglobulina. En un aspecto, el al menos un alelo de cadena pesada de inmunoglobulina comprende un segmento génico V H humano, un segmento génico D H humano, y un segmento génico J H humano en un locus de cadena pesada de ratón endógeno que comprende un gen de cadena pesada humana que expresa una cadena pesada humana/de ratón. En un aspecto específico, el ratón comprende dos alelos de cadena pesada de inmunoglobulina, y el ratón expresa una cadena pesada humana/de ratón.

25 En un aspecto, el ratón comprende un primer alelo de cadena ligera, que comprende un hV κ no reordenado y un hJ κ no reordenado, en un locus κ de ratón endógeno que comprende un gen C κ endógeno; y un segundo alelo de cadena ligera que comprende un hV λ no reordenado y un hJ λ no reordenado, en un locus λ de ratón endógeno que comprende un gen C λ endógeno intacto como se indica en las reivindicaciones. En un aspecto específico, el primer y el segundo alelo de cadena ligera son los únicos alelos de cadena ligera funcionales del ratón modificado genéticamente. En un aspecto, el gen C λ endógeno intacto es C λ 2.

30 En un aspecto, el ratón comprende seis alelos de inmunoglobulina, donde el primer alelo comprende un segmento génico V λ y J λ de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno que comprende un gen C κ de ratón, el segundo comprende un segmento génico V κ y J κ de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno que comprende un gen C λ de ratón intacto como se indica en las reivindicaciones, el cuarto y quinto comprenden cada uno independientemente un segmento génico V H y D H y J H no reordenados en un locus de cadena pesada de ratón endógeno que comprende un gen de cadena pesada de ratón, y el sexto comprende (a) un segmento génico V λ y J λ de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno que comprende un gen C λ de ratón, (b) un locus λ que es no funcional, o (c) una delección en la totalidad o en parte del locus λ .

35 En un aspecto, el primer alelo comprende un hV λ y hJ λ no reordenado. En un aspecto, el segundo alelo comprende un hV κ y hJ κ no reordenado. El tercer alelo comprende un hV λ y hJ λ no reordenado. En un aspecto, el cuarto y quinto comprenden cada uno independientemente un hV H y hD H y hJ H no reordenado. En un aspecto, el sexto alelo comprende un locus λ de ratón endógeno que está delecionado en su totalidad o en parte.

40 En un aspecto, el ratón comprende seis alelos de inmunoglobulina, donde el primer alelo comprende un segmento génico V λ y J λ de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno que comprende un gen C λ de ratón intacto, el segundo comprende un segmento génico V λ y J λ de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno que comprende un gen C λ de ratón, el tercero comprende un segmento génico V κ y J κ de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno que comprende un gen C κ de ratón, el cuarto y quinto comprenden cada uno independientemente un segmento génico V H y D H y J H no reordenado en un locus de cadena pesada de ratón endógeno que comprende un gen de cadena pesada de ratón, y el sexto comprende (a) un segmento génico V κ y J κ de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno que comprende un gen C κ de ratón, (b) un locus κ que es no funcional, o (c) una delección de uno o más elementos del locus κ .

45 En un aspecto, el primer alelo comprende un segmento génico hV λ y hJ λ no reordenado. En un aspecto, el segundo alelo comprende un segmento génico hV λ y hJ λ no reordenado. En un aspecto, el tercer alelo comprende un segmento génico hV κ y hJ κ no reordenado. En un aspecto, el cuarto y quinto comprenden cada uno independientemente un segmento génico hV H y hD H y hJ H no reordenado. En un aspecto, el sexto alelo comprende un locus κ de ratón endógeno que está funcionalmente silenciado.

En un aspecto, el ratón modificado genéticamente comprende una célula B que comprende un gen de anticuerpo reordenado que comprende un dominio hVλ reordenado unido de forma funcional a un dominio Cλ de ratón intacto. En una realización específica, el dominio Cλ de ratón se obtiene de un gen Cλ2.

- 5 También se describe un ratón modificado genéticamente que expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia Vλ-Jλ humana reordenada y una secuencia Cλ de ratón.

También se describe un ratón que expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera derivada de un gen hVλ, uno hJA y uno Cλ de ratón. En un aspecto específico la región Cλ es Cλ2. En un aspecto específico, el anticuerpo comprende adicionalmente una cadena pesada que comprende un dominio variable derivado de un segmento génico V humano, uno D humano y uno J humano, y un dominio constante de cadena pesada derivado de un gen de la región constante de cadena pesada de ratón. En un aspecto, el gen de la región constante de cadena pesada de ratón comprende una secuencia bisagra CH₂-CH₃ de un dominio constante de cadena pesada. En otro aspecto, el gen de la región constante de cadena pesada de ratón comprende una secuencia CH₁ bisagra- CH₂-CH₃ de un dominio constante de cadena pesada. En otro aspecto, el gen de la región constante de cadena pesada de ratón comprende una secuencia CH₁-CH₂-CH₃-CH₄ de un dominio constante de cadena pesada. En otro aspecto, el gen de la región constante de cadena pesada de ratón comprende una secuencia CH₂-CH₃-CH₄ de un dominio constante de cadena pesada.

20 En un aspecto, el ratón expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera λ de inmunoglobulina reordenada que comprende una secuencia Vλ/Jλ humana seleccionada de 3-1/1, 3-1/7, 4-3/1, 4-3/7, 2-8/1, 3-9/1, 3-10/1, 3-10/3, 3-10/7, 2-14/1, 3-19/1, 2-23/1, 3-25/1, 1-40/1, 1-40/2, 1-40/3, 1-40/7, 7-43/1, 7-43/3, 1-44/1, 1-44/7, 5-45/1, 5-45/2, 5-45/7, 7-46/1, 7-46/2, 7-46/7, 9-49/1, 9-49/2, 9-49/7 y 1-51/1.

25 También se describe un ratón que expresa un anticuerpo que comprende (a) una cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada derivado de un segmento génico de la región variable de cadena pesada humana no reordenado, donde el dominio variable de cadena pesada está fusionado a una región constante de cadena pesada (C_H) de ratón; y, (b) una cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera derivado de un hVλ y un hJλ no reordenado donde el dominio variable de cadena ligera está fusionado a una región Cλ de ratón intacta.

En un aspecto, el ratón comprende (i) un locus de cadena pesada que comprende un remplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V, D y J de ratón endógenos funcionales con todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V, D y J humanos funcionales, un gen C_H de ratón, (ii) un primer locus de cadena ligera λ que comprende un remplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos Vλ y Jλ de ratón endógenos funcionales con todos, sustancialmente todos, o una pluralidad de, segmentos génicos hVλ y hJλ funcionales, y un gen Cλ de ratón intacto, (iii) un segundo locus de cadena ligera λ que comprende un remplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos Vλ y Jλ de ratón endógenos funcionales con todos, sustancialmente todos, o una pluralidad de, segmentos génicos hVλ y hJλ funcionales, y un gen Cλ de ratón intacto. En un aspecto específico, el gen Cλ de ratón intacto es Cλ2.

En un aspecto, el ratón comprende una delección de un gen Cκ y/o un segmento génico Vκ y/o uno Jκ. En una realización, el ratón comprende un locus de cadena ligera κ no funcional.

45 También se describe un ratón modificado genéticamente que expresa un anticuerpo, donde más del 10 %, más del 15 %, más del 20 %, más del 25 %, más del 30 %, más del 35 %, más del 40 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, o más del 90 % del anticuerpo IgG total producido por el ratón comprende un dominio variable derivado de λ, y donde el ratón expresa anticuerpos que comprenden un dominio variable derivado de κ fusionado con una región Cκ de ratón. En aspectos específicos, aproximadamente el 15-40 %, 20-40 %, 25-40 %, 30-40 %, o 35-40 % de anticuerpo total producido por el ratón comprende un dominio variable derivado de λ.

En un aspecto, el dominio variable derivado de λ se obtiene de un hVλ y un hJλ. En un aspecto específico, la región variable derivada de λ está en una cadena ligera que comprende una región Cλ de ratón. En otro aspecto específico, la región Cλ es una región Cλ2. También se describe una construcción de ADN aislado que comprende un brazo de homología cadena arriba y un brazo de homología cadena abajo, donde los brazos de homología cadena arriba y cadena abajo dirigen la construcción a un locus κ de ratón, y la construcción comprende un segmento hVλ no reordenado funcional y un segmento hJλ no reordenado funcional, y una secuencia de selección o marcadora.

También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un brazo de direccionamiento para dirigir una secuencia λ de ratón cadena arriba de Vλ2 de ratón, un casete de selección flanqueado 5' y 3' con sitios de reconocimiento por recombinasa, y un brazo de direccionamiento para dirigir una secuencia λ de ratón 3' de Jλ2 de ratón. En un aspecto, el casete de selección es un casete Hyg-TK flanqueado por Frt. En un aspecto, el brazo de direccionamiento 3' comprende Cλ2, Jλ4, Cλ4 de ratón y el potenciador de ratón 2.4.

65

- 5 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un brazo de direccionamiento para dirigir el locus λ de ratón 5' con respecto a $V\lambda 1$, un casete de selección flanqueado 5' y 3' con sitios de reconocimiento por recombinasa, y un brazo de direccionamiento 3' para dirigir una secuencia λ de ratón 3' con respecto a $C\lambda 1$ de ratón. En un aspecto, el casete de selección es un casete de neomicina flanqueado por lox. En un aspecto, el brazo de direccionamiento 3' comprende el potenciador 3' λ de ratón y el potenciador 3' λ de ratón 3.1.
- 10 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un brazo de direccionamiento para dirigir el locus λ de ratón 5' con respecto a $V\lambda 2$, un casete de selección flanqueado 5' y 3' con sitios de reconocimiento por recombinasa, y un brazo de direccionamiento 3' para dirigir una secuencia λ de ratón 3' con respecto a $J\lambda 2$ de ratón y 5' con respecto a $C\lambda 2$ de ratón. En un aspecto, el casete de selección es un casete de higromicina-TK flanqueado por Frt. En un aspecto, el brazo de direccionamiento 3' comprende los segmentos génicos $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ de ratón y el potenciador λ de ratón 2.4.
- 15 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un brazo de direccionamiento para dirigir el locus λ de ratón 5' con respecto a $V\lambda 2$, un casete de selección flanqueado 5' y 3' con sitios de reconocimiento por recombinasa, un fragmento genómico humano que comprende una región contigua del locus de cadena ligera λ humana desde $hV\lambda 3$ -12 cadena abajo hasta el final de $hJ\lambda 1$, y un brazo de direccionamiento 3' para dirigir una secuencia λ de ratón 3' con respecto a $J\lambda 2$ de ratón. En un aspecto, el casete de selección es un casete de neomicina flanqueado por Frt. En un aspecto, el brazo de direccionamiento 3' comprende los segmentos génicos $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ de ratón y el potenciador λ de ratón 2.4.
- 20 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende una región contigua del locus de cadena ligera λ humana desde $hV\lambda 3$ -12 cadena abajo hasta el final de $hJ\lambda 1$.
- 25 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un brazo de direccionamiento para dirigir el locus λ de ratón 5' con respecto a $V\lambda 2$, un casete de selección flanqueado 5' y 3' con sitios de reconocimiento por recombinasa y un fragmento genómico humano que comprende una región contigua del locus de cadena ligera λ humana desde $hV\lambda 3$ -27 cadena abajo hasta el final de $hV\lambda 2$ -8. En un aspecto, el casete de selección es un casete de higromicina flanqueado por Frt. En un aspecto, el fragmento genómico humano comprende un brazo de direccionamiento 3'. En un aspecto específico, el brazo de direccionamiento 3' comprende aproximadamente 53 kb del locus de cadena ligera λ humana desde $hV\lambda 3$ -12 cadena abajo hasta el final de $hV\lambda 2$ -8.
- 30 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende una región contigua del locus de cadena ligera λ humana desde $hV\lambda 3$ -27 cadena abajo hasta el final de $hV\lambda 3$ -12.
- 35 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un brazo de direccionamiento para dirigir el locus λ de ratón 5' con respecto a $V\lambda 2$, un casete de selección flanqueado 5' y 3' con sitios de reconocimiento por recombinasa, un primer fragmento genómico humano que comprende una región contigua del locus de cadena ligera λ humana desde $hV\lambda 5$ -52 cadena abajo hasta el final de $hV\lambda 1$ -40, un sitio para enzimas de restricción, y un segundo fragmento genómico humano que comprende una región contigua del locus de cadena ligera λ humana desde $hV\lambda 3$ -29 cadena abajo hasta el final de $hV\lambda 82K$. En un aspecto, el casete de selección es un casete de neomicina flanqueado por Frt. En un aspecto, el sitio para enzimas de restricción es un sitio para una endonucleasa constitutiva. En un aspecto específico, la endonucleasa constitutiva es PI-Scel. En un aspecto, el segundo fragmento genómico humano es un brazo de direccionamiento 3'. En un aspecto específico, el brazo de direccionamiento 3' comprende aproximadamente 27 kb del locus de cadena ligera λ humana desde $hV\lambda 3$ -29 cadena abajo hasta el final de $hV\lambda 82K$.
- 40 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende una región contigua del locus de cadena ligera λ humana desde $hV\lambda 5$ -52 cadena abajo hasta el final de $hV\lambda 1$ -40.
- 45 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un brazo de direccionamiento para dirigir el locus κ de ratón 5' con respecto a los segmentos génicos $V\kappa$ endógenos, dos sitios de reconocimiento por recombinasa yuxtapuestos, un casete de selección 3' a los sitios de reconocimientos por recombinasa yuxtapuestos, y un brazo de direccionamiento 3' para dirigir una secuencia κ de ratón 5' con respecto a los segmentos génicos variables de cadena ligera κ . En un aspecto, los sitios de reconocimiento por recombinasa yuxtapuestos están en orientación opuesta con respecto uno del otro. En un aspecto específico, los sitios de reconocimiento por recombinasa son diferentes. En otro aspecto específico, los sitios de reconocimiento por recombinasa son un sitio loxP y un sitio lox511. En un aspecto, el casete de selección es un casete de neomicina.
- 50 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un brazo de direccionamiento para dirigir el locus κ de ratón 5' con respecto a los segmentos génicos $J\kappa$ de ratón, un casete de selección, un sitio de reconocimiento por recombinasa 3' al casete de selección, y un brazo de direccionamiento 3' para dirigir una secuencia κ de ratón 3' con respecto a los segmentos génicos $J\kappa$ de ratón y 5'

al potenciador intrónico κ de ratón. En un aspecto, el casete de selección es un casete de higromicina-TK. En un aspecto, el sitio de reconocimiento por recombinasa está en la misma dirección con respecto a la transcripción que el casete de selección. En un aspecto específico, el sitio de reconocimiento por recombinasa es un sitio *loxP*.

5 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un primer fragmento genómico de ratón que comprende la secuencia 5' de los segmentos génicos V_{κ} de ratón endógenos, un primer sitio de reconocimiento por recombinasa, un segundo sitio de reconocimiento por recombinasa, y un segundo fragmento genómico de ratón que comprende la secuencia 3' de los segmentos génicos J_{κ} de ratón endógenos y 5' del potenciador intrónico κ de ratón.

10 También se describe un ratón modificado genéticamente, donde la modificación genética comprende una modificación con una o más de las construcciones de ADN descritas anteriormente o en este documento.

15 También se describe el uso de una construcción de ADN aislado para crear un ratón como se describe en este documento. También se describe el uso de una construcción de ADN aislado como se describe en este documento en un método para preparar una proteína de unión a antígeno.

20 También se describe una célula madre no humana que comprende un vector de direccionamiento que comprende una construcción de ADN como se ha descrito anteriormente y en este documento. También se describe una célula madre no humana, donde la célula madre no humana se obtiene de un ratón descrito en este documento.

En un aspecto, la célula madre no humana es una célula madre embrionaria (ES). En un aspecto específico, la célula ES es una célula ES de ratón.

25 También se describe el uso de una célula madre no humana como se describe en este documento para crear un ratón como se describe en este documento. También se describe el uso de una célula madre no humana como se describe en este documento para preparar una proteína de unión a antígeno.

30 También se describe un embrión de ratón, donde el embrión de ratón comprende una modificación genética como se describe en este documento. En un aspecto, se describe un embrión de ratón hospedador que comprende una célula ES donante, donde la célula ES donante comprende una modificación genética como se describe en este documento. En un aspecto, el embrión de ratón es un embrión en fase premórula. En un aspecto específico, el embrión en fase premórula es un embrión en fase de 4 células o un embrión en fase de 8 células. En otro aspecto específico, el embrión de ratón es un blastocisto.

35 También se describe el uso de un embrión de ratón como se describe en este documento para crear un ratón como se describe en ese documento. En un aspecto, se describe el uso de un embrión de ratón como se describe en este documento para preparar una proteína de unión a antígeno.

40 También se describe una célula no humana, donde la célula no humana comprende una secuencia génica de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada derivada de un ratón modificado genéticamente como se describe en este documento. En un aspecto, la célula es una célula B. En un aspecto, la célula es un hibridoma. En un aspecto, la célula codifica un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina y/o un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que está mutado somáticamente.

45 También se describe una célula no humana, donde la célula no humana comprende una secuencia génica de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada derivada de un ratón modificado genéticamente como se describe en este documento. En un aspecto, la célula es una célula B. En un aspecto, la célula es un hibridoma. En un aspecto, la célula codifica un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina y/o un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que está mutado somáticamente.

50 También se describe el uso de una célula no humana como se describe en este documento para crear un ratón como se describe en este documento. En un aspecto, se describe el uso de una célula no humana como se describe en este documento para preparar una proteína de unión a antígeno.

55 También se describe una célula B de ratón que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende (a) una región variable derivada de un segmento génico hV_{λ} y un segmento génico hJ_{λ} ; y, (b) un gen C_{λ} de ratón. En un aspecto específico, el gen C_{λ} es $C_{\lambda 2}$. En un aspecto, la célula B de ratón expresa adicionalmente una cadena pesada afín que comprende (c) una región variable derivada de un segmento hV_H , uno hD_H , y (d) uno hJ_H . En un aspecto, la célula B no comprende un gen λ reordenado. En otro aspecto, la célula B no comprende un gen κ reordenado.

60 También se describe un método para preparar un anticuerpo en un ratón modificado genéticamente, que comprende: (a) exponer un ratón modificado genéticamente a un antígeno, donde el ratón tiene un genoma que comprende al menos un hV_{λ} , y al menos un hJ_{λ} en un locus de cadena ligera endógeno, donde el locus de cadena ligera endógeno comprende un gen C_{λ} de ratón; (b) permitir que el ratón modificado genéticamente desarrolle una

65

respuesta inmunitaria contra el antígeno; y, (c) aislar del ratón de (b) un anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno, o aislar del ratón de (b) una célula que comprende un dominio de inmunoglobulina que reconoce específicamente el antígeno, donde el anticuerpo comprende una cadena ligera derivada de un gen hV λ , uno hJ λ y uno C λ de ratón.

5 En un aspecto, se describe un método para preparar un anticuerpo en un ratón modificado genéticamente, que comprende: (a) exponer un ratón modificado genéticamente a un antígeno, donde el ratón tiene un genoma que comprende al menos un hV λ en un locus de cadena ligera λ y al menos un J λ en el locus de cadena ligera λ , donde el locus de cadena ligera λ comprende un gen C λ de ratón intacto; (b) permitir que el ratón modificado genéticamente desarrolle una respuesta inmunitaria al antígeno; y, (c) aislar del ratón de (b) un anticuerpo que reconozca específicamente el antígeno, o aislar del ratón de (b) una célula que comprenda un dominio de inmunoglobulina que reconozca específicamente el antígeno, o identificar en el ratón de (b) una secuencia de ácido nucleico que codifique un dominio variable de cadena pesada y/o ligera que se una al antígeno, donde el anticuerpo comprende una cadena ligera derivada de un hV λ , un hJ λ y un gen C λ de ratón.

15 El gen constante de cadena ligera λ es un gen C λ de ratón intacto. En un aspecto específico, el gen C λ de ratón intacto se selecciona entre C λ 1, C λ 2 y C λ 3. En un aspecto más específico, el gen C λ de ratón es C λ 2.

20 También se describe un método para preparar un gen de anticuerpo reordenado en un ratón modificado genéticamente, que comprende: (a) exponer un ratón modificado genéticamente a un antígeno, donde la modificación genética comprende un hV λ y un hJ λ en un locus de cadena ligera endógeno, donde el locus de cadena ligera endógeno comprende un gen C λ de ratón intacto; y, (b) identificar un gen de inmunoglobulina reordenado en dicho ratón, donde el gen de inmunoglobulina reordenado comprende un segmento génico de región variable de cadena ligera λ y un gen C λ o fragmento funcional del mismo.

25 En un aspecto, el método comprende adicionalmente clonar una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada y/o ligera del ratón, donde la región variable de cadena pesada y/o ligera es de un anticuerpo que comprende un V λ humano y un C λ de ratón.

30 En un aspecto, se describe un método para preparar un gen de anticuerpo reordenado en un ratón modificado genéticamente, que comprende: (a) exponer un ratón modificado genéticamente a un antígeno, donde la modificación genética comprende un hV λ y un hJ λ , en un locus de cadena ligera λ de ratón, donde el locus de cadena ligera λ comprende un gen C λ de ratón intacto; y, (b) identificar un gen de inmunoglobulina reordenado en dicho ratón, donde el gen de inmunoglobulina reordenado comprende un segmento génico de región variable de cadena ligera λ y un gen C λ .

35 El gen constante de cadena ligera λ es un gen C λ de ratón intacto.

40 En un aspecto, el método comprende adicionalmente clonar una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada y/o ligera del ratón, donde la región variable de cadena pesada y/o ligera es de un anticuerpo que comprende un V λ humano y un C λ de ratón.

45 También se describe un método para preparar un anticuerpo, que comprende exponer un ratón como se describe en este documento a un antígeno, permitir que el ratón monte una respuesta inmunitaria que comprende crear un anticuerpo que se una específicamente al antígeno, identificar una secuencia de ácido nucleico reordenada en el ratón que codifique la cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico en el ratón que codifique una secuencia del dominio variable de cadena ligera afin de un anticuerpo, donde el anticuerpo se une específicamente al antígeno, y emplear las secuencias de ácido nucleico de los dominios variables de cadena pesada y ligera fusionados a dominios constantes humanos para crear un anticuerpo deseado, donde el anticuerpo deseado comprende una cadena ligera que comprende un dominio V λ fusionado a un dominio C λ . El dominio V λ es humano y el dominio C λ es un dominio C λ de ratón.

50 En un aspecto, se describe un método para preparar un anticuerpo, que comprende exponer un ratón como se describe en ese documento a un antígeno, permitir que el ratón monte una respuesta inmunitaria que comprende crear un anticuerpo que se une específicamente al antígeno, identificar una secuencia de ácido nucleico reordenada en el ratón que codifique un dominio variable de cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico reordenada que codifique una secuencia de dominio variable de cadena ligera afin de un anticuerpo, donde el anticuerpo se une específicamente al antígeno, y emplear las secuencias de ácido nucleico fusionadas a secuencias de ácido nucleico que codifican un dominio constante de cadena pesada humana y un dominio constante de cadena ligera humana para crear un anticuerpo derivado de secuencias humanas, donde el anticuerpo que se une específicamente al antígeno comprende una cadena ligera que comprende un dominio V λ humano fusionado a una región C λ de ratón.

55 En un aspecto, la región C λ de ratón se selecciona entre C λ 1, C λ 2 y C λ 3. En un aspecto específico, la región C λ de ratón es C λ 2.

60 En un aspecto, la región C λ de ratón se selecciona entre C λ 1, C λ 2 y C λ 3. En un aspecto específico, la región C λ de ratón es C λ 2.

65

En un aspecto, se describe un método para preparar una secuencia génica de la región variable de cadena ligera de anticuerpo reordenada, que comprende (a) exponer un ratón como se describe en este documento a un antígeno; (b) permitir que el ratón monte una respuesta inmunitaria; (c) identificar una célula en el ratón que comprenda una secuencia de ácido nucleico que codifique una secuencia del dominio V λ humano reordenado fusionada con un dominio C λ de ratón, donde la célula también codifica una cadena pesada afín que comprende un dominio V H humano y un dominio C H de ratón, y donde la célula expresa un anticuerpo que se une al antígeno; (d) clonar a partir de la célula una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio V λ humano y una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio V H humano afín; y, (e) usar la secuencia de ácido nucleico clonada que codifica el dominio V λ humano y la secuencia de ácido nucleico clonada que codifica el dominio V H humano afín para crear un anticuerpo completamente humano.

En un aspecto, se describe un método para preparar una secuencia génica de la región variable de cadena ligera de anticuerpo reordenada, que comprende (a) exponer un ratón como se describe en este documento a un antígeno; (b) permitir que el ratón monte una respuesta inmunitaria al antígeno; (c) identificar una célula en el ratón que comprenda ADN que codifique una secuencia del dominio V λ humano reordenado fusionada a un dominio C λ de ratón, donde la célula también codifica una cadena pesada afín que comprende un dominio V H humano y un dominio C H de ratón, y donde la célula expresa un anticuerpo que se une al antígeno; (d) clonar a partir de la célula una secuencia de ácido nucleico que codifique el dominio V λ humano reordenado y una secuencia de ácido nucleico que codifique el dominio V H humano afín; y, (e) usar la secuencia de ácido nucleico clonada que codifica el dominio V λ humano y la secuencia de ácido nucleico clonada que codifica el dominio V H humano afín para crear un anticuerpo completamente humano. En un aspecto, el dominio C λ de ratón es C λ 2 de ratón.

También se describe un ratón modificado genéticamente que expresa una cadena ligera derivada de λ humana fusionada a una región constante de cadena ligera endógena (C λ), donde el ratón, tras inmunización con el antígeno, crea un anticuerpo que comprende un dominio V λ humano fusionado a un dominio C λ de ratón. En un aspecto específico, el dominio C λ es C λ 2.

También se describe un ratón modificado genéticamente que comprende un locus de cadena ligera λ endógeno modificado como se describe en este documento, que expresa una pluralidad de cadenas ligeras λ de inmunoglobulina asociadas con una pluralidad de cadenas pesadas de inmunoglobulina. En un aspecto, la cadena pesada comprende una secuencia humana. En diversos aspectos, la secuencia humana se selecciona de una secuencia variable, una C H 1, una bisagra, una C H 2, una C H 3, y una combinación de las mismas. En un aspecto, la pluralidad de cadenas ligeras λ de inmunoglobulina comprende una secuencia humana. En diversos aspectos, la secuencia humana se selecciona entre una secuencia variable, una secuencia constante, y una combinación de las mismas. En un aspecto, el ratón comprende un locus de inmunoglobulina endógeno deshabilitado y expresa la cadena pesada a partir de un transgén o epísona extracromosómico. En un aspecto, el ratón comprende un replazo en un locus de ratón endógeno de algunos o todos los segmentos génicos de cadena pesada de ratón endógenos (es decir, V, D, J), y/o algunas o todas las secuencias constantes de cadena pesada de ratón endógenas (por ejemplo, C H 1, bisagra, C H 2, C H 3, o una combinación de las mismas), y/o algunas o todas las secuencias de cadena ligera de ratón endógenas (por ejemplo, V, J, constante, o una combinación de las mismas), con una o más secuencias de inmunoglobulina humana.

También se describe un ratón adecuado para preparar anticuerpos que tienen una cadena ligera derivada de λ humana donde todos o sustancialmente todos los anticuerpos preparados en el ratón se expresan con una cadena ligera derivada de λ humana. En un aspecto, la cadena ligera derivada de λ humana se expresa a partir de un locus de cadena ligera endógeno.

También se describe un método para preparar una cadena ligera derivada de λ para un anticuerpo humano, que comprende obtener de un ratón como se describe en este documento una secuencia de cadena ligera y una secuencia de cadena pesada, y emplear la secuencia de cadena ligera y la secuencia de cadena pesada en la preparación de un anticuerpo humano.

También se describe un método para preparar una proteína de unión a antígeno, que comprende exponer un ratón como se describe en este documento a un antígeno; permitir que el ratón monte una respuesta inmunitaria; y obtener del ratón una proteína de unión a antígeno que se une al antígeno, u obtener del ratón una secuencia a emplear en la preparación de una proteína de unión a antígeno que se une al antígeno.

También se describe una célula derivada de un ratón como se describe en este documento. En un aspecto, la célula se selecciona entre una célula madre embrionaria, una célula pluripotente, una célula pluripotente inducida, una célula B, y un hibridoma.

También se describe una célula que comprende una modificación genética como se describe en este documento. En un aspecto, la célula es una célula de ratón. En un aspecto, la célula se selecciona entre un hibridoma y un cuádrima. En un aspecto, la célula expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una secuencia variable λ humana fusionada a una secuencia constante λ de ratón.

También se describe un tejido derivado de un ratón como se describe en este documento.

También se describe el uso de un ratón o una célula como se describe en este documento para preparar una proteína de unión a antígeno. En un aspecto, la proteína de unión a antígeno es una proteína humana. En un aspecto, la proteína humana es un anticuerpo humano.

También se describe una proteína de unión a antígeno creada por un ratón, célula, tejido, o método como se describe en este documento. En un aspecto, la proteína de unión a antígeno es una proteína humana. En un aspecto, la proteína humana es un anticuerpo humano.

Breve descripción de las figuras

La **Fig. 1** muestra una ilustración detallada, no a escala, del locus de cadena ligera λ humana que incluye los grupos de segmentos génicos $V\lambda$ (A, B y C) y los pares de regiones $J\lambda$ y $C\lambda$ (pares J-C).

La **Fig. 2** muestra una ilustración general, no a escala, de una estrategia de direccionamiento usada para inactivar el locus de cadena ligera λ de ratón endógeno.

La **Fig. 3** muestra una ilustración general, no a escala, de una estrategia de direccionamiento usada para inactivar el locus de cadena ligera κ de ratón endógeno.

La **Fig. 4A** muestra una ilustración general, no a escala de un vector de direccionamiento inicial para abordar el locus de cadena ligera λ de ratón endógeno con secuencias de cadena ligera λ humana incluyendo 12 segmentos génicos $hV\lambda$ y el segmento génico $hJ\lambda 1$ (vector de direccionamiento 12/1- λ).

La **Fig. 4B** muestra una ilustración general, no a escala, de cuatro vectores de direccionamiento iniciales para abordar el locus de cadena ligera κ de ratón endógeno con secuencias de cadena ligera λ humana incluyendo 12 segmentos génicos $hV\lambda$, y el segmento génico $hJ\lambda 1$ (vector de direccionamiento 12/1- κ), 12 segmentos génicos $hV\lambda$ y los segmentos génicos $hJ\lambda 1, 2, 3$ y 7 (vector de direccionamiento 12/4- κ), 12 segmentos génicos $hV\lambda$, una secuencia genómica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana y el segmento génico $hJ\lambda 1$ (vector de direccionamiento (12(κ)1- κ) y 12 segmentos génicos $hV\lambda$, una secuencia genómica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana y los segmentos génicos $hJ\lambda 1, 2, 3$ y 7 (vector de direccionamiento 12(κ)4- κ).

La **Fig. 5A** muestra una ilustración general, no a escala, de una estrategia de direccionamiento para la inserción progresiva de 40 segmentos génicos $hV\lambda$ y un único segmento génico $hJ\lambda$ en el locus de cadena ligera λ de ratón.

La **Fig. 5B** muestra una ilustración general, no a escala, de una estrategia de direccionamiento para la inserción progresiva de 40 segmentos génicos $hV\lambda$ y un único segmento génico $hJ\lambda$ en el locus κ de ratón.

La **Fig. 6** muestra una ilustración general, no a escala, de las etapas de direccionamiento e ingeniería molecular empleadas para preparar vectores de direccionamiento híbridos λ - κ humanos únicos para la construcción de un locus de cadena ligera híbrido que contenga una secuencia intergénica κ humana, múltiples segmentos génicos $hJ\lambda$ o ambos.

La **Fig. 7A** muestra una ilustración general, no a escala, de la estructura del locus para un locus de cadena ligera λ de ratón modificado que contiene 40 segmentos génicos $hV\lambda$ y un único segmento génico $hJ\lambda$ unido de forma funcional al gen $C\lambda 2$ endógeno.

La **Fig. 7B** muestra una ilustración general, no a escala, de la estructura del locus para cuatro loci de cadena ligera κ de ratón modificados independientes que contienen 40 segmentos génicos $hV\lambda$ y uno o cuatro segmentos génicos $hJ\lambda$ con o sin una secuencia genómica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana contigua unida de forma funcional al gen $C\kappa$ endógeno.

La **Fig. 8A** muestra diagramas de contorno de esplenocitos $Ig\lambda^+$ e $Ig\kappa^+$ sincronizados con $CD19^+$ a partir de un ratón de tipo silvestre (WT), un ratón homocigótico para 12 segmentos génicos $hV\lambda$ y cuatro $hJ\lambda$ incluyendo una secuencia genómica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana (12 $hV\lambda$ - $V\kappa$ - $J\kappa$ -4 $hJ\lambda$) y un ratón homocigótico para 40 segmentos génicos $hV\lambda$ y uno $hJ\lambda$ (40 $hV\lambda$ -1 $hJ\lambda$).

La **Fig. 8B** muestra la cantidad total de células B $CD19^+$ en bazos recogidos de ratones de tipo silvestre (WT), ratones homocigóticos para 12 segmentos génicos $hV\lambda$ y cuatro $hJ\lambda$ incluyendo una secuencia genómica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana (12 $hV\lambda$ - $V\kappa$ - $J\kappa$ -4 $hJ\lambda$) y ratones homocigóticos para 40 segmentos génicos $hV\lambda$ y uno $hJ\lambda$ (40 $hV\lambda$ -1 $hJ\lambda$).

La **Fig. 9A**, en el panel superior, muestra diagramas de contorno de esplenocitos sincronizados con singletes y teñidos para células B y T ($CD19^+$ y $CD3^+$, respectivamente) de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigótico para 40 segmentos génicos $hV\lambda$ y cuatro $J\lambda$ incluyendo una secuencia genómica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana (40 $hV\lambda$ - $V\kappa$ - $J\kappa$ -4 $hJ\lambda$). El panel inferior muestra diagramas de contorno de esplenocitos sincronizados con $CD19^+$ y teñidos para la expresión de $Ig\lambda^+$ e $Ig\kappa^+$ a partir de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigótico para 40 segmentos génicos $hV\lambda$ y cuatro $J\lambda$ incluyendo una secuencia genómica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana (40 $hV\lambda$ - $V\kappa$ - $J\kappa$ -4 $hJ\lambda$).

La **Fig. 9B** muestra la cantidad total de células B $CD19^+$, $CD19^+Ig\kappa^+$ y $CD19^+Ig\lambda^+$ en bazos recogidos de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones homocigóticos para 40 segmentos génicos $hV\lambda$ y cuatro $J\lambda$ incluyendo una secuencia genómica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana (40 $hV\lambda$ - $V\kappa$ - $J\kappa$ -4 $hJ\lambda$).

La **Fig. 9C** muestra diagramas de contorno de esplenocitos sincronizados con $CD19^+$ y teñidos para inmunoglobulina D (IgD) e inmunoglobulina M (IgM) de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigótico para 40 segmentos génicos $hV\lambda$ y cuatro $J\lambda$ incluyendo una secuencia genómica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana (40 $hV\lambda$ - $V\kappa$ - $J\kappa$ -4 $hJ\lambda$). Se aprecian células B maduras (72 para WT, 51 para 40 $hV\lambda$ - $V\kappa$ - $J\kappa$ -4 $hJ\lambda$) y transicionales (13 para WT, 22 para 40 $hV\lambda$ - $V\kappa$ - $J\kappa$ -4 $hJ\lambda$) en cada uno de los diagramas de contorno.

La **Fig. 9D** muestra la cantidad total de células B $CD19^+$, células B transicionales ($CD19^+IgM^{hi}IgD^{lo}$) y células B

maduras (CD19⁺IgM^{lo}IgD^{hi}) en bazos recogidos de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones homocigóticos para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ).

La **Fig. 10A**, en el panel superior, muestra diagramas de contorno de médula ósea teñida para células B y T (CD19⁺ y CD3⁺, respectivamente) a partir de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigótico para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ). El panel inferior muestra diagramas de contorno de médula ósea sincronizados con CD19⁺ y teñida para ckit⁺ y CD43⁺ a partir de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigótico para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ). Se observan células Pro y Pre B en los diagramas de contorno del panel inferior.

La **Fig. 10B** muestra la cantidad de células B Pro (CD19⁺ CD43⁺ ckit⁺) y Pre (CD19⁺ CD43⁺ ckit⁺) B en médula ósea recogidas de los fémures de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones homocigóticos para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ).

La **Fig. 10C** muestra diagramas de contorno de médula ósea sincronizados con singletes teñida para inmunoglobulina M (IgM) y B220 a partir de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigótico para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ). Se observan células inmaduras, maduras y pro/pre B en cada uno de los diagramas de contorno.

La **Fig. 10D** muestra la cantidad total de células B inmaduras (B220^{int}IgM⁺) y maduras (B220^{hi}IgM⁺) en médula ósea aislada de los fémures de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones homocigóticos para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ).

La **Fig. 10E** muestra diagramas de contorno de médula ósea sincronizados con células B inmaduras (B220^{int}IgM⁺) y maduras (B220^{hi}IgM⁺) teñidas para la expresión de Igλ e Igκ aisladas de los fémures de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigótico para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ).

La **Fig. 11** muestra una alineación de secuencia de nucleótidos de la unión Vλ-Jλ-Cκ de dieciocho clones de RT-PCR independientes amplificados a partir de ARN de esplenocitos de ratones que albergan secuencias génicas de cadena ligera λ humana en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno. A6 = SEQ ID NO: 57; B6 = SEQ ID NO: 58; F6 = SEQ ID NO: 59; B7 = SEQ ID NO: 60; E7 = SEQ ID NO: 61; F7 = SEQ ID NO: 62; C8 = SEQ ID NO: 63; E12 = SEQ ID NO: 64; 1-4 = SEQ ID NO: 65; 1-20 = SEQ ID NO: 66; 3B43 = SEQ ID NO: 67; 5-8 = SEQ ID NO: 68; 5-19 = SEQ ID NO: 69; 1010 = SEQ ID NO: 70; 11A1 = SEQ ID NO: 71; 7A8 = SEQ ID NO: 72; 3A3 = SEQ ID NO: 73; 2-7 = SEQ ID NO: 74. Las bases en letra minúscula indican bases no de la línea germinal resultantes de mutación y/o adición de N durante la recombinación. Los aminoácidos consenso dentro de la región flanqueante 4 (FWR4) codificada por la secuencia de nucleótidos de hJλ1 y Cκ de ratón se indican en la parte inferior de la alineación de secuencia.

La **Fig. 12** muestra una alineación de secuencia de nucleótidos de la unión Vλ-Jλ-Cκ de doce clones de RT-PCR independientes amplificados a partir de ARN de esplenocitos de ratones que albergan secuencias génicas de cadena ligera λ humana incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana contigua en un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno. 5-2 = SEQ ID NO: 87; 2-5 = SEQ ID NO: 88; 1-3 = SEQ ID NO: 89; 4B-1 = SEQ ID NO: 90; 3B-5 = SEQ ID NO: 91; 7A-1 = SEQ ID NO: 92; 5-1 = SEQ ID NO: 93; 4A-1 = SEQ ID NO: 94; 11A-1 = SEQ ID NO: 95; 5-7 = SEQ ID NO: 96; 5-4 = SEQ ID NO: 97; 2-3 = SEQ ID NO: 98. Las bases en letra minúscula indican bases no de la línea germinal resultantes de mutación y/o adición de N durante la recombinación. Los aminoácidos consenso dentro de la región flanqueante 4 (FWR4) codificada por la secuencia de nucleótidos de cada Jλ humana y Cκ de ratón se indican en la parte inferior de la alineación de secuencia.

La **Fig. 13** muestra una alineación de secuencia de nucleótidos de la unión Vλ-Jλ-Cλ de tres clones de RT-PCR independientes amplificados a partir de ARN de esplenocitos de ratones que albergan secuencias génicas de cadena ligera λ humana en un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno. 2D1 = SEQ ID NO: 101; 209 = SEQ ID NO: 102; 3E15 = SEQ ID NO: 103. Las bases en letra minúscula indican bases no de la línea germinal resultantes de mutación y/o adición de N durante la recombinación. Los aminoácidos consenso dentro de la región flanqueante 4 (FWR4) codificada por la secuencia de nucleótidos de hJλ1 y Cλ2 de ratón se indican en la parte inferior de la alineación de secuencia.

Descripción detallada

La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.

El término "contiguo" incluye referencias a la existencia en la misma molécula de ácido nucleico, por ejemplo, dos secuencias de ácido nucleico son "contiguas" si aparecen en la misma molécula de ácido nucleico, pero están interrumpidas por otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, una secuencia V(D)J reordenada es "contigua" con una secuencia génica de región constante, aunque el codón final de la secuencia V(D)J no esté seguida inmediatamente por el primer codón de la secuencia de región constante. En otro ejemplo, dos secuencias del segmento génico V son "contiguas" si aparecen en el mismo fragmento genómico, aunque pueden estar separadas por una secuencia que no codifica un codón de la región V, por ejemplo, pueden estar separadas por una secuencia reguladora, por ejemplo, un promotor u otra secuencia no codificante. En una realización, una secuencia contigua incluye un fragmento genómico que contiene secuencias genómicas ordenadas como se encuentra en un genoma de tipo silvestre.

La expresión "derivado de" cuando se usa con referencia a una región variable "derivada de" un gen o segmento génico citado incluye la capacidad de rastrear la secuencia de vuelta a un segmento génico no reordenado particular o segmentos génicos que se reordenaron para formar un gen que expresa el dominio variable (justificando, cuando sea aplicable, diferencias de corte y empalme y mutaciones somáticas).

El término "funcional" cuando se usa con referencia a un segmento génico de región variable o segmento génico de unión se refiere al uso en un repertorio expresado de anticuerpos; por ejemplo, en seres humanos, los segmentos génicos 3-1, 4-3, 2-8, etc. son funcionales, mientras que los segmentos génicos $V\lambda$ 3-2, 3-4, 2-5, etc. son no funcionales.

Un "locus de cadena pesada" incluye una localización en un cromosoma, por ejemplo, un cromosoma de ratón, donde en un ratón de tipo silvestre se encuentran secuencias de ADN de región variable de cadena pesada (V_H), de diversidad de cadena pesada (D_H), de unión de cadena pesada (J_H), y constante de cadena pesada (C_H).

Un "locus κ " incluye una locación en un cromosoma, por ejemplo, un cromosoma de ratón, donde en un ratón de tipo silvestre se encuentran secuencias de ADN de la región variable κ ($V\kappa$), de unión κ ($J\kappa$) y constante κ ($C\kappa$).

Un "locus λ " incluye una locación en un cromosoma, por ejemplo, un cromosoma de ratón, donde en un ratón de tipo silvestre se encuentran secuencias de ADN de la región variable λ ($V\lambda$), de unión λ ($J\lambda$) y constante λ ($C\lambda$).

El término "no reordenado" incluye el estado de un locus de inmunoglobulina donde los segmentos génicos V y los segmentos génicos J (para cadenas pesadas, también segmentos génicos D) se mantienen por separado pero son capaces de unirse para formar un gen V(D)J reordenado que comprende un único V,(D),J del repertorio V(D)J.

25 **Ratones que expresan dominios variables λ humanos**

Se ha informado previamente de ratones que expresan anticuerpos que son completamente humanos, o parcialmente humanos y parcialmente de ratón. Los ratones modificados por ingeniería genética VELOCIMMUNE® comprenden un remplazo de segmentos génicos V(D)J no reordenados en los loci de ratón endógenos con segmentos génicos V(D)J humanos. Los ratones VELOCIMMUNE® expresan anticuerpos quiméricos que tienen dominios variables humanos y dominios constantes de ratón (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.605.237). La mayoría de los demás informes se refieren a ratones que expresan anticuerpos completamente humanos a partir de transgenes completamente humanos en ratones que tienen deshabilitados los loci de inmunoglobulina endógenos.

Las cadenas ligeras de anticuerpo se codifican por uno de dos loci diferentes: kappa (κ) y lambda (λ). Las cadenas ligeras de anticuerpo de ratón son principalmente del tipo κ . Los ratones que crean anticuerpos de ratón, y ratones modificados que crean anticuerpos completamente humanos o quiméricos humanos-de ratón, presentan una desviación en el uso de cadena ligera. Los seres humanos también muestran una desviación en la cadena ligera, pero no es tan pronunciada como en ratones; la relación de cadenas ligeras κ a cadenas ligeras λ en ratones es de aproximadamente 95:5, mientras que en seres humanos la relación es de aproximadamente 60:40. La desviación más pronunciada en ratones no se cree que afecte de forma importante a la diversidad de anticuerpos, porque en ratones el locus variable λ no es tan diverso en primera instancia. Esto no es así en seres humanos. El locus de cadena ligera λ humana es muy diverso.

El locus de cadena ligera λ humano se extiende en más de 1.000 kb y contiene más de 80 genes que codifican segmentos variables (V) o de unión (J) (FIG. 1). Dentro del locus de cadena ligera λ humano, más de la mitad de todos los dominios $V\lambda$ observados están codificados por los segmentos génicos 1-40, 1-44, 2-8, 2-14, y 3-21. Globalmente, aproximadamente 30 segmentos génicos $V\lambda$ humanos o así, se cree que son funcionales. Existen siete segmentos génicos $J\lambda$, solo cuatro de los cuales se consideran segmentos génicos $J\lambda$ generalmente funcionales, $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$, y $J\lambda 7$.

El locus de cadena ligera λ en seres humanos es similar en estructura al locus κ tanto de ratones como de seres humanos porque el locus de cadena ligera λ humano tiene varios segmentos génicos de región variable que son capaces de recombinarse para formar una proteína de cadena ligera funcional. El locus de cadena ligera λ humano contiene aproximadamente 70 segmentos génicos V y 7 pares de segmentos génicos $J\lambda$ - $C\lambda$. Solamente cuatro de estos pares de segmentos génicos $J\lambda$ - $C\lambda$ parecen ser funcionales. En algunos alelos, un quinto par de segmentos génicos $J\lambda$ - $C\lambda$ es supuestamente un pseudogén ($C\lambda 6$). Los 70 segmentos génicos $V\lambda$ parecen contener 38 segmentos génicos funcionales. Las 70 secuencias $V\lambda$ están ordenadas en tres grupos, todos los cuales contienen diferentes miembros de distintos grupos de la familia génica V (grupos A, B y C; FIG. 1). Esta es una fuente potencialmente rica de diversidad relativamente inexplorada para generar anticuerpos con regiones V humanas en animales no humanos.

En marcado contraste, el locus de cadena ligera λ de ratón contiene solamente dos o tres (dependiendo de la cepa) segmentos génicos de la región $V\lambda$ de ratón (FIG. 2). Al menos por esta razón, el importante desvío κ en ratones no se cree que sea particularmente perjudicial para la diversidad total de anticuerpos.

De acuerdo con los mapas publicados del locus de cadena ligera λ de ratón, el locus consiste esencialmente en dos grupos de segmentos génicos con un lapso de aproximadamente 200 kb (FIG. 2). Los dos grupos contienen dos conjuntos de genes V, J, y C que tienen capacidad de reordenamiento independiente: $V\lambda 2$ - $J\lambda 2$ - $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ y $V\lambda 1$ - $J\lambda 3$ - $C\lambda 3$ - $J\lambda 1$ - $C\lambda 1$. Aunque se ha descubierto que $V\lambda 2$ se recombina con todos los segmentos génicos $J\lambda$, $V\lambda 1$ parece recombinarse exclusivamente con $C\lambda 1$. Se cree que $C\lambda 4$ es un pseudogén con sitios defectuosos de corte y empalme.

El locus de cadena ligera κ de ratón es notablemente diferente. La estructura y cantidad de segmentos génicos que participan en los eventos de recombinación que conducen a una proteína de cadena ligera funcional a partir de un locus κ de ratón es mucho más compleja (FIG. 3). Por tanto, las cadenas ligeras λ de ratón no contribuyen en gran medida a la diversidad de una población de anticuerpos en un ratón típico.

Explotar la rica diversidad del locus de cadena ligera λ de ratón en ratones probablemente produciría, entre otras cosas, una fuente para un repertorio humano más completo de dominios V de cadena ligera. Intentos previos por aprovechar esta diversidad usaron transgenes humanos que contenían porciones del locus de cadena ligera λ humano incorporados aleatoriamente en el genoma de ratón (véase, por ejemplo, el documento US 6.998.514 y el documento US 7.435.871). Ratones que contienen estos transgenes integrados aleatoriamente expresan supuestamente cadenas ligeras λ completamente humanas, sin embargo, en algunos casos, uno o ambos loci de cadena ligera endógenos permanecen intactos. Esta situación no es deseable ya que las secuencias de cadena ligera λ humanas compiten con la cadena ligera de ratón (κ o λ) en el repertorio expresado de anticuerpos del ratón.

En contraste, los inventores describen ratones modificados genéticamente que son capaces de expresar una o más secuencias de ácido nucleico de cadena ligera λ directamente a partir de un locus de cadena ligera de ratón λ endógeno. Los ratones modificados genéticamente capaces de expresar secuencias de cadena ligera λ humana a partir de un locus λ endógeno pueden cruzarse adicionalmente con ratones que comprenden un locus de cadena pesada humana y por tanto usarse para expresar anticuerpos que comprenden regiones V (pesada y ligera λ) que son completamente humanas. Las regiones V se expresan con regiones constantes de ratón. En diversos aspectos, no hay segmentos génicos de inmunoglobulina de ratón endógenos presentes y las regiones V se expresan con las regiones constantes humanas. Estos anticuerpos demostrarían ser útiles en numerosas aplicaciones, tanto de diagnóstico así como terapéuticas.

Pueden lograrse muchas ventajas para diversos aspectos de expresión de proteínas de unión derivadas de segmentos génicos $V\lambda$ y $J\lambda$ humanos en ratones. Las ventajas pueden lograrse colocando secuencias λ humanas en el locus de cadena ligera λ endógeno. Los anticuerpos creados a partir de dichos ratones pueden tener cadenas ligeras que comprenden dominios $V\lambda$ humanos fusionados a una región $C\lambda$ de ratón. Los ratones también expresarán dominios $V\lambda$ humanos que son adecuados para la identificación y clonación para su uso con regiones $C\lambda$ humanas, específicamente regiones $C\lambda$ y/o $C\lambda$. Como el desarrollo de células B en dichos ratones por lo demás es normal, es posible generar dominios $V\lambda$ compatibles (incluyendo dominios $V\lambda$ mutados somáticamente) en el contexto de regiones $C\lambda$ o $C\lambda$.

Se describen ratones modificados genéticamente que comprenden un segmento génico $V\lambda$ humano no reordenado y un $J\lambda$ humano no reordenado en un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno. Se describen ratones que expresan anticuerpos que comprenden una cadena ligera que tiene un dominio $V\lambda$ humano fusionado a una región $C\lambda$.

Enfoques para modificar por ingeniería ratones para que expresen dominios $V\lambda$ humanos

Se describen diversos enfoques para generar ratones modificados genéticamente que creen anticuerpos que contengan una cadena ligera que tenga un dominio $V\lambda$ humano fusionado a una región $C\lambda$ endógena. Se describen modificaciones genéticas que, en diversos aspectos, comprenden una delección de uno o ambos loci de cadena ligera endógenos. Por ejemplo, para eliminar cadenas ligeras λ de ratón del repertorio endógeno de anticuerpos puede hacerse una delección de un primer grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ y remplazo, en su totalidad o en parte, de los segmentos génicos $V\lambda$ - $J\lambda$ de un segundo grupo génico con segmentos génicos $V\lambda$ - $J\lambda$ humanos, como se indica en las reivindicaciones. También se describen embriones de ratón modificados genéticamente, células, y construcciones de direccionamiento para generar los ratones, embriones de ratón, y células.

La delección de un grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ endógeno y el remplazo de los segmentos génicos $V\lambda$ - $J\lambda$ de otro grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ endógeno emplea una alteración relativamente mínima en la asociación y función de la región constante de anticuerpo natural en el animal, en diversos aspectos, porque los genes $C\lambda$ endógenos se dejan intactos y por lo tanto retienen funcionalidad y capacidad normales de asociarse con la región constante de una cadena pesada endógena. Por tanto, en dichos aspectos, la modificación no afecta a otras regiones constantes de cadena pesada endógenas dependientes de las regiones constantes de cadena ligera funcionales para el ensamblaje de una molécula de anticuerpo funcional que contenga dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Además, en diversos aspectos, la modificación no afecta al ensamblaje de una molécula de anticuerpo unida a una membrana funcional que implica una cadena pesada endógena y una cadena ligera, por ejemplo, un dominio $hV\lambda$ unido a una región $C\lambda$ de ratón. Como al menos un gen $C\lambda$ funcional se retiene en el locus endógeno, los animales

que contienen un remplazo de los segmentos génicos V λ -J λ de un grupo génico V λ -J λ -C λ endógeno con segmentos génicos V λ -J λ humanos deben ser capaces de crear cadenas ligeras λ normales que sean capaces de unirse al antígeno durante una respuesta inmunitaria a través de los segmentos génicos V λ -J λ humanos presentes en el repertorio expresado de anticuerpos del animal.

5 Se proporciona una ilustración esquemática (no a escala) de un grupo génico V λ -J λ -C λ de ratón endógeno deletado en la FIG. 2. Como se ilustra, el locus de cadena ligera λ de ratón está organizado en dos grupos génicos, ambos cuales contienen segmentos génicos funcionales capaces de recombinarse para formar una cadena ligera λ funcional de ratón. El grupo génico V λ 1-J λ 3-C λ 3-J λ 1-C λ 1 de ratón endógeno se deleta mediante una construcción de direccionamiento (vector de direccionamiento 1) con un casete de neomicina flanqueado por sitios de recombinación. El otro grupo génico endógeno (V λ 2-V λ 3-J λ 2-C λ 2-J λ 4-C λ 4) se deleta en parte mediante una construcción de direccionamiento (vector de direccionamiento 2) con un casete de higromicina-timidina quinasa flanqueado por sitios de recombinación. En este segundo evento de direccionamiento, se retienen los segmentos génicos endógenos C λ 2-J λ 4-C λ 4. La segunda construcción de direccionamiento (vector de direccionamiento 2) se construye usando sitios de recombinación que son diferentes a los de la primera construcción de direccionamiento (vector de direccionamiento 1) permitiendo de ese modo la delección selectiva del casete de selección después de que se haya conseguido un direccionamiento satisfactorio. El locus doblemente abordado resultante se silencia funcionalmente porque no puede producir cadena ligera λ endógena. Este locus modificado puede usarse para la inserción de segmentos génicos V λ y J λ humanos para crear un locus λ de ratón endógeno que comprenda segmentos génicos V λ y J λ humanos, mediante lo cual, tras la recombinación en el locus modificado, el animal produce cadenas ligeras λ que comprenden segmentos génicos V λ y J λ humanos reordenados unidos a un segmento génico C λ de ratón endógeno.

25 Modificar genéticamente un ratón para hacer que los segmentos génicos λ endógenos sean no funcionales, en diversos aspectos, produce un ratón que muestra exclusivamente cadenas ligeras κ en su repertorio de anticuerpos, haciendo que el ratón sea útil para evaluar el papel de las cadenas ligeras λ en la respuesta inmunitaria, y útil para generar un repertorio de anticuerpos que comprenda dominios V κ pero no dominios V λ .

30 Un ratón modificado genéticamente que expresa un hV λ unido a un gen C λ de ratón que se ha recombinado en el locus de cadena ligera λ de ratón endógeno puede generarse por cualquier método conocido en la técnica. Se proporciona una ilustración esquemática (no a escala) del remplazo de los segmentos génicos V λ 2-V λ 3-J λ 2 de ratón endógenos con segmentos génicos V λ y J λ humanos en la FIG. 4A. Como se ilustra, se reemplaza un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno que se ha vuelto no funcional por una construcción de direccionamiento (vector de direccionamiento 12/1- λ) que incluye un casete de neomicina flanqueado por sitios de recombinación. Los segmentos génicos V λ 2-V λ 3-J λ 2 se reemplazan con un fragmento genómico que contiene la secuencia λ humana que incluye doce segmentos génicos hV λ y un único segmento génico hJ λ .

40 Por tanto, este primer enfoque sitúa uno o más segmentos génicos hV λ en el locus de cadena ligera λ endógeno contiguo con un segmento génico hJ λ único (FIG. 4A).

45 Pueden conseguirse modificaciones adicionales en el locus de cadena ligera λ endógeno modificado usando técnicas similares para insertar más segmentos génicos hV λ . Por ejemplo, se proporcionan ilustraciones esquemáticas de dos construcciones de direccionamiento adicionales (vectores de direccionamiento +16- λ y +12- λ) usadas para la inserción progresiva de segmentos génicos hV λ humanos adicionales en la FIG. 5A. Como se ilustra, se insertan fragmentos genómicos adicionales que contienen segmentos génicos hV λ humanos específicos en el locus de cadena ligera λ endógeno modificado en etapas sucesivas usando homología proporcionada por la inserción previa de secuencias de cadena ligera λ humanas. Tras la recombinación con cada construcción de direccionamiento ilustrada, de modo secuencial, se insertan 28 segmentos génicos hV λ adicionales en el locus de cadena ligera λ endógeno modificado. Esto crea un locus quimérico que produce una proteína de cadena ligera λ que comprende segmentos génicos V λ -J λ humanos unidos a un gen C λ de ratón.

55 Los enfoques anteriores para insertar segmentos génicos de cadena ligera λ humana en el locus λ de ratón, mantienen los potenciadores posicionados cadena abajo de los segmentos génicos C λ 2-J λ 4-C λ 4 (denominados Enh 2.4, Enh y Enh 3.1, FIG. 4A y FIG. 5A). Este enfoque produce un único alelo modificado en el locus de cadena ligera λ de ratón endógeno (FIG. 7A).

60 También se describen composiciones y métodos para generar un ratón que exprese una cadena ligera que comprenda segmentos génicos hV λ y J λ unidos de forma funcional a un segmento génico C λ de ratón, incluyendo composiciones y métodos para generar un ratón que expresa dichos genes a partir de un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno. Los métodos incluyen volver no funcional, de forma selectiva, un grupo génico V λ -J λ -C λ de ratón endógeno (por ejemplo, mediante delección dirigida), y emplear segmentos génicos hV λ y J λ en el locus de cadena ligera λ de ratón endógeno para expresar un dominio hV λ en un ratón.

65 También se describe un segundo enfoque donde pueden posicionarse segmentos génicos de cadena ligera λ humana en el locus de cadena ligera κ endógeno. La modificación genética, en diversos aspectos, comprende una delección del locus de cadena ligera κ endógeno. Por ejemplo, para eliminar cadenas ligeras κ de ratón del repertorio

endógeno de anticuerpos, puede hacerse una delección de los segmentos génicos V κ y J κ de ratón. También se describen embriones de ratón modificados genéticamente, células, y construcciones de direccionamiento para generar los ratones, embriones de ratón, y células.

5 Por las razones indicadas anteriormente, la delección de los segmentos génicos V κ y J κ de ratón emplea una alteración relativamente mínima. Se proporciona una ilustración esquemática (no a escala) de segmentos génicos V κ y J κ de ratón delecionados en la FIG. 3. Los segmentos génicos V κ y J κ de ratón endógenos se delecionan mediante delección mediada por recombinasa de secuencias de ratón posicionadas entre dos vectores de direccionamiento posicionados de forma precisa que emplean cada uno sitios de recombinación específicos de sitio.
 10 Se emplea un primer vector de direccionamiento (vector de direccionamiento J κ) en un primer evento de direccionamiento para delecionar los segmentos génicos J κ de ratón. Se emplea un segundo vector de direccionamiento (vector de direccionamiento V κ) en un segundo evento de direccionamiento secuencial para delecionar una secuencia localizada 5' del segmento génico V κ de ratón más distal. Ambos vectores de direccionamiento contienen sitios de recombinación específicos de sitio permitiendo de ese modo la delección selectiva de ambos casetes de selección y todas las secuencias intermedias de cadena ligera κ de ratón después de haber conseguido un direccionamiento satisfactorio. El locus delecionado resultante se silencia funcionalmente porque no puede producir cadena ligera κ endógena. Este locus modificado puede usarse para la inserción de segmentos génicos hV λ y J λ para crear un locus κ de ratón endógeno que comprenda segmentos génicos hV λ y J λ , por lo cual, tras la recombinación en el locus modificado, el animal produce cadenas ligeras λ que comprenden segmentos génicos hV λ y J λ reordenados unidos de forma funcional a un segmento génico C κ de ratón endógeno. Pueden usarse diversos vectores de direccionamiento que comprenden secuencias de cadena ligera λ humana junto con este locus κ de ratón delecionado para crear un locus de cadena ligera híbrido que contenga segmentos génicos λ humanos unidos de forma funcional con una región C κ de ratón.

25 Por tanto, un segundo enfoque posiciona uno o más segmentos génicos V λ humanos en el locus de cadena ligera κ de ratón contiguo con un segmento génico J λ humano único (vector de direccionamiento 12/1- κ , FIG. 4B).

Pueden hacerse modificaciones a este enfoque y añadir segmentos génicos y/o secuencias reguladoras para optimizar el uso de las secuencias de cadena ligera λ humanas desde el locus κ de ratón dentro del repertorio de anticuerpos de ratón.
 30

También se describe un tercer enfoque donde, se posicionan uno o más segmentos génicos hV λ en el locus de cadena ligera κ de ratón contiguos con cuatro secuencias génicas hJ λ (vector de direccionamiento 12/4- κ , FIG. 4B).

35 En un tercer enfoque, se posicionan uno o más segmentos génicos hV λ en el locus de cadena ligera κ de ratón contiguo con una secuencia intergénica κ humana y una única secuencia génica hJ λ (vector de direccionamiento 12(κ)1- κ , FIG. 4B).

40 También se describe un cuarto enfoque, donde se posicionan uno o más segmentos génicos hV λ en el locus de cadena ligera κ de ratón contiguo con una secuencia intergénica κ humana y cuatro secuencias génicas hJ λ (vector de direccionamiento 12(κ)4- κ , FIG. 4B).

45 Todos los enfoques anteriores para insertar segmentos génicos de cadena ligera λ humana en el locus κ de ratón, mantienen el elemento potenciador intrónico κ cadena arriba del gen C κ (denominado E κ 1, FIG. 4B y FIG. 5B) y el potenciador κ 3' cadena abajo del gen C κ (denominado E κ 3', FIG. 4B y FIG. 5B). Los enfoques producen cuatro alelos modificados diferentes en el locus de cadena ligera κ de ratón endógeno (FIG. 7B).

Anticuerpos de dominio lambda a partir de ratones modificados genéticamente

50 Ratones que comprenden secuencias λ humanas en el locus de cadena ligera λ de ratón expresada en una cadena ligera que comprende una región hV λ fusionada a una región C λ de ratón. Estos se cruzan ventajosamente con ratones que (a) comprenden un locus de cadena ligera funcionalmente silenciado (por ejemplo, una eliminación del locus de cadena ligera κ o λ de ratón endógeno); (b) comprenden un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno que comprende segmentos génicos hV y hJ unidos de forma funcional a un gen C λ de ratón endógeno como se indica en las reivindicaciones; (c) comprenden un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno que comprende segmentos génicos hV κ y hJ κ unidos de forma funcional a un gen C κ de ratón endógeno; y, (d) un ratón en que un alelo κ comprende hV κ y hJ κ ; comprendiendo el otro alelo κ hV λ y hJ λ ; comprendiendo un alelo λ hV λ y hJ λ y un alelo λ silenciado o eliminado, o comprendiendo ambos alelos λ hV λ y hJ λ ; y, dos alelos de cadena pesada que comprenden cada uno hV H , hD H , y hJ H .

60 Los anticuerpos que comprenden los dominios hV λ expresados en el contexto de C λ se usan para generar anticuerpos completamente humanos por clonación de los ácidos nucleicos que codifican los dominios hV λ en construcciones de expresión que albergan genes que codifican C λ humano. Las construcciones de expresión resultantes se transfectan en células hospedadoras adecuadas para expresar anticuerpo que presentas un dominio hV λ completo fusionado a hC λ .
 65

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir el modo en que preparar y usar métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Salvo que se indique de otro modo, la temperatura se indica en Celsius, y la presión es en o cerca de la atmosférica.

Ejemplo I

Delección de los loci de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón

Se prepararon diversas construcciones de direccionamiento usando tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.586.251 y Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659) para modificar bibliotecas de Cromosoma Artificial Bacteriano (BAC) genómico de ratón para inactivar los loci de cadena ligera κ y λ de ratón.

Delección del locus de cadena ligera λ de ratón. Se modificó ADN del clon BAC de ratón RP23-135k15 (Invitrogen) por recombinación homóloga para inactivar el locus de cadena ligera λ de ratón endógeno a través de delección dirigida de los grupos génicos $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ (Fig. 2)

En resumen, se delecionó el grupo proximal completo que comprende los segmentos génicos $V\lambda 1$ - $J\lambda 3$ - $C\lambda 3$ - $J\lambda 1$ - $C\lambda 1$ en un único evento de direccionamiento usando un vector de direccionamiento que comprende un casete de neomicina flanqueado por sitios *loxP* con un brazo de homología de ratón 5' que contenía la secuencia 5' del segmento génico $V\lambda 1$ y un brazo de homología de ratón 3' que contenía la secuencia 3' del segmento génico $C\lambda 1$ (Fig. 2, vector de direccionamiento 1).

Se preparó una segunda construcción de direccionamiento para deleccionar de forma precisa el grupo génico λ de ratón endógeno distal que contenía $V\lambda 2$ - $J\lambda 2$ - $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ excepto que la construcción de direccionamiento contenía un brazo de homología de ratón 5' que contenía la secuencia 5' del segmento génico $V\lambda 2$ y un brazo de homología de ratón 3' que contenía la secuencia 5' al segmento génico $C\lambda 2$ endógeno (Fig. 2, vector de direccionamiento 2). Por tanto, la segunda construcción de direccionamiento deleccionaba de forma precisa $V\lambda 2$ - $J\lambda 2$, dejando al mismo tiempo $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ intacto en el locus λ de ratón endógeno. Se confirmaron células ES que contenían un locus λ endógeno inactivado (como se ha descrito anteriormente) por métodos de cariotipado y exploración (por ejemplo, TAQMAN®) conocidos en la técnica. Después se aisló el ADN de las células ES modificadas y se sometió a tratamiento con recombinasa CRE mediando de ese modo la delección del casete de direccionamiento proximal que contenía el gen marcador de neomicina, dejando solamente un único sitio *loxP* en el punto de delección (Fig. 2, parte inferior).

Delección del locus de cadena ligera κ de ratón. Se prepararon varias construcciones de direccionamiento usando métodos similares descritos anteriormente para modificar el ADN de clones BAC de ratón RP23-302g12 y RP23-254m04 (Invitrogen) por recombinación homóloga para inactivar el locus de cadena ligera κ de ratón en un proceso de dos etapas (Fig. 3)

En resumen, se deleccionaron los segmentos génicos $J\kappa$ (1-5) del locus de cadena ligera κ de ratón endógeno en un único evento de direccionamiento usando un vector de direccionamiento que comprendía un casete de higromicina-timidina quinasa (*hyg*-TK) que contenía un único sitio *loxP* 3' al casete *hyg*-TK (Fig. 3, vector de direccionamiento de $J\kappa$). Los brazos de homología usados para preparar este vector de direccionamiento contenían la secuencia genómica de ratón 5' y 3' de los segmentos génicos $J\kappa$ de ratón endógenos. En un segundo evento de direccionamiento, se preparó un segundo vector de direccionamiento para deleccionar una parte de la secuencia genómica de ratón cadena arriba (5') al segmento génico $V\kappa$ de ratón endógeno más distal (Fig. 3, vector de direccionamiento de $V\kappa$). Este vector de direccionamiento contenía un sitio *lox511* invertido, un sitio *loxP* y un casete de neomicina. Los brazos de homología usados para preparar este vector de direccionamiento, contenían la secuencia genómica de ratón cadena arriba del segmento génico $V\kappa$ de ratón más distal. Los vectores de direccionamiento e usaron de un modo secuencial (es decir, $J\kappa$ después $V\kappa$) para abordar el ADN en células ES. Se confirmaron ES que albergaban un cromosoma doblemente abordado (es decir, un único locus κ de ratón endógeno abordado con ambos vectores de direccionamiento) por métodos de cariotipado y exploración (por ejemplo, Taqman™) conocidos en la técnica. Después se aisló el ADN de las células ES modificadas y se sometió a tratamiento con recombinasa Cre mediando de ese modo la delección de los segmentos génicos $V\kappa$ de ratón endógenos y ambos casetes de selección, dejando al mismo tiempo dos sitios *lox* yuxtapuestos en orientación opuesta uno con relación al otro (Fig. 3, parte inferior; SEQ ID NO: 1).

Por tanto, se crearon dos loci de cadena ligera endógenos modificados (κ y λ) que contenían regiones potenciadoras y constantes intactas para insertar de forma progresiva segmentos génicos de la línea germinal λ humana no reordenados de un modo preciso usando los vectores de direccionamiento descritos a continuación.

Ejemplo II**Reemplazo de loci de cadena ligera de ratón con un minilocus de cadena ligera λ humana**

5 Se diseñaron por ingeniería múltiples vectores de direccionamiento para la inserción progresiva de segmentos génicos λ humanos en los loci de cadena ligera κ y λ de ratón endógenos usando métodos similares a los descritos anteriormente. Se hicieron múltiples modificaciones iniciales independientes a los loci de cadena ligera, endógenos produciendo cada uno un locus de cadena ligera quimérico que contenía segmentos génicos $hV\lambda$ y $J\lambda$ unidos de forma funcional a genes constantes de cadena ligera de ratón y potenciadores.

10 **Un minilocus λ humano que contiene 12 segmentos génicos $V\lambda$ humanos y uno $J\lambda$ humano.** Se diseñó una serie de vectores de direccionamiento iniciales para que contuvieran los primeros 12 segmentos génicos $V\lambda$ humanos consecutivos del grupo A y un segmento génico $hJ\lambda 1$ o cuatro segmentos génicos $hJ\lambda$ usando un clon BAC humano llamado RP11-729g4 (Invitrogen). Las Fig. 4A y 4B muestran los vectores de direccionamiento que se construyeron para hacer una inserción inicial de los segmentos génicos de cadena ligera λ humana en los loci de cadena ligera λ y κ de ratón respectivamente.

15 Para un primer conjunto de vectores de direccionamiento iniciales, se diseñó un fragmento de ADN de 124.125 pb a partir del clon BAC 729g4 que contenía 12 segmentos génicos $hV\lambda$ y un segmento génico $hJ\lambda 1$ para que contuviera un sitio PI-SceI 996 pb cadena abajo (3') del segmento génico $hJ\lambda 1$ para el ligamiento de un brazo de homología de ratón 3'. Se usaron dos conjuntos diferentes de brazos de homología para el ligamiento a este fragmento humano; un conjunto de brazos de homología contenía secuencias λ de ratón endógenas del clon BAC 135k15 (Fig. 4A) y otro conjunto contenía la secuencia κ endógena 5' y 3' de los segmentos génicos $V\kappa$ y $J\kappa$ de ratón de los clones BAC de ratón RP23-302g12 y RP23-254m04, respectivamente (Fig. 4B).

20 Para el vector de direccionamiento 12/1- λ (Fig. 4A), se diseñó un sitio PI-SceI en el extremo 5' de un fragmento de ADN de 27.847 pb que contenía el $C\lambda 2$ - $J\lambda 5$ - $C\lambda 4$ de ratón y el potenciador 2.4 del locus λ de ratón modificado descrito en el Ejemplo 1. El fragmento de ratón de ~28 kb se usó como brazo de homología 3' por ligamiento al fragmento λ humano de ~124 kb, que creó una unión 3' que contenía, de 5' a 3', un segmento génico $hJ\lambda 1$, 996 pb de la secuencia λ humana 3' del segmento génico $hJ\lambda 1$, 1.229 pb de la secuencia λ de ratón 5' al gen $C\lambda 2$ de ratón, el gen $C\lambda 2$ de ratón y la parte restante del fragmento de ratón de ~28 kb. Cadena arriba (5') del segmento génico $V\lambda 3$ -12 humano había 1.456 pb adicionales de la secuencia λ humana antes del inicio del brazo de homología de ratón 5', que contenía 23.792 pb del ADN genómico de ratón correspondiente a la secuencia 5' del locus λ de ratón endógeno. Entre el brazo de homología 5' y el inicio de la secuencia λ humana había un casete de neomicina flanqueado por sitios Frt.

25 Por tanto, el vector de direccionamiento 12/1- λ incluía de 5' a 3', un brazo de homología 5' que contenía ~24 kb de la secuencia genómica λ de ratón 5' del locus λ endógeno, un sitio Frt 5', un casete de neomicina, un sitio Frt 3', ~123 kb de la secuencia λ genómica humana que contenía los 12 primeros segmentos génicos $hV\lambda$ consecutivos y un segmento génico $hJ\lambda 1$, un sitio PI-SceI, y un brazo de homología 3' que contenía ~28 kb de la secuencia genómica de ratón que incluye los segmentos génicos $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ endógenos, la secuencia del potenciador 2.4 de ratón y la secuencia genómica de ratón adicional cadena abajo (3') del potenciador 2.4 (Fig. 4A).

30 De un modo similar, el vector de direccionamiento 12/1- κ (Fig. 4B) empleó el mismo fragmento λ humano ~124 con la excepción de que se usaron brazos de homología de ratón que contenían la secuencia κ de ratón de modo que pudiera conseguirse direccionamiento al locus κ endógeno por recombinación homóloga. Por tanto, el vector de direccionamiento 12/1- κ incluía, de 5' a 3', un brazo de homología 5' que contenía ~23 kb de la secuencia genómica de ratón 5' del locus κ endógeno, un sitio I-CeuI y, un sitio Frt 5', un casete de neomicina, un sitio Frt 3', ~124 kb de la secuencia λ genómica humana que contenía los 12 primeros segmentos génicos $hV\lambda$ consecutivos y un segmento génico $hJ\lambda 1$, un sitio PI-SceI, y un brazo de homología 3' que contenía ~28 kb de la secuencia genómica de ratón que incluye el gen $C\kappa$ de ratón endógeno, $E\kappa 1$ y $E\kappa 3'$ y la secuencia genómica de ratón adicional cadena abajo (3') de $E\kappa 3'$ (Fig. 4B, vector de direccionamiento 12/1- κ).

35 La recombinación homóloga con cualquiera de estos dos vectores de direccionamiento iniciales creó un locus de cadena ligera de ratón modificado (κ o λ) que contenía 12 segmentos génicos $hV\lambda$ y un segmento génico $hJ\lambda 1$ unido de forma funcional al gen constante de cadena ligera de ratón endógeno y los potenciadores ($C\kappa$ o $C\lambda 2$ y $E\kappa 1/E\kappa 3'$ o $Enh 2.4/Enh 3.1$) que, tras la recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera λ quimérica.

40 **Un minilocus λ humano con 12 segmentos génicos $V\lambda$ humanos y cuatro $J\lambda$ humanos.** En otro enfoque para añadir diversidad a un locus de cadena ligera λ quimérico, se diseñó un tercer vector de direccionamiento inicial para insertar los doce primeros segmentos génicos $V\lambda$ humanos consecutivos del grupo A y los segmentos génicos $hJ\lambda 1$, 2, 3 y 7 en el locus de cadena ligera κ de ratón (Fig. 4B, vector de direccionamiento 12/4- κ). Se preparó un segmento de ADN que contenía los segmentos génicos $hJ\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$ y $J\lambda 7$ por síntesis de ADN *de novo* (Integrated DNA Technologies) incluyendo cada segmento génico $J\lambda$ y la secuencia genómica humana de ~100 pb de las regiones 5' y 3' inmediatas de cada segmento génico $J\lambda$. Se diseñó un sitio PI-SceI en el extremo 3' de este fragmento de ADN de ~1 kb y se ligó a un casete de cloranfenicol. Los brazos de homología se amplificaron por

PCR a partir de la secuencia λ humana en las posiciones 5' y 3' respecto al segmento génico hJL1 del clon BAC humano 729g4. Se realizó recombinación homóloga con este vector de direccionamiento intermedio sobre un clon BAC 729g4 modificado que se había abordado previamente cadena arriba (5') del segmento génico V λ 3-12 humano con un casete de neomicina flanqueado por sitios Frt, que también contenía un sitio I-Ceul 5' al sitio Frt 5'. El clon BAC 729g4 doblemente abordado incluía de 5' a 3' un sitio I-Ceul, un sitio Frt 5', un casete de neomicina, un sitio Frt 3', un fragmento de ~123 kb que contenía los 12 primeros segmentos génicos hV λ , un fragmento de ~1 kb que contenía los segmentos génicos J λ 1, 2, 3 y 7 humanos, un sitio PI-Scel, y un casete de cloranfenicol. Este vector de direccionamiento intermedio se digirió junto con I-Ceul y PI-Scel y posteriormente se ligó en el clon BAC de ratón modificado (descrito anteriormente) para crear el tercer vector de direccionamiento.

Este ligamiento provocó un tercer vector de direccionamiento para la inserción de secuencias λ humanas en el locus de cadena ligera κ endógeno, que incluía de 5' a 3', un brazo de homología de ratón 5' que contenía ~23 kb de la secuencia genómica 5' del locus κ de ratón endógeno, un sitio I-Ceul, un sitio Frt 5', un casete de neomicina, un sitio Frt 3', un fragmento de ~123 kb que contenía los 12 primeros segmentos génicos hV λ , un fragmento de ~1 kb que contenía los segmentos génicos hJ λ 1, 2, 3 y 7, un sitio PI-Scel y un brazo de homología 3' que contenía ~28 kb de la secuencia genómica de ratón que incluye el gen C κ de ratón endógeno, Eki y Ek3' y la secuencia genómica de ratón adicional cadena abajo (3') de Ek3' (Fig. 4B, vector de direccionamiento 12/4- κ). La recombinación homóloga con este tercer vector de direccionamiento creó un locus de cadena ligera κ de ratón modificado que contenía 12 segmentos génicos hV λ y cuatro segmentos génicos hJ λ unidos de forma funcional al gen C κ de ratón endógeno que, tras la recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera quimérica λ humana/ κ de ratón.

Un minilocus λ humano con una secuencia de cadena ligera κ humana integrada. De un modo similar, se diseñaron dos vectores de direccionamiento adicionales similares a los diseñados para hacer una inserción inicial de segmentos génicos λ humanos en el locus de cadena ligera κ endógeno (Fig. 4B, vectores de direccionamiento 12/1- κ y 12/4- κ) para insertar progresivamente segmentos génicos de cadena ligera λ humana usando vectores de direccionamiento especialmente contruidos que contenían secuencias genómicas λ y κ humanas contiguas. Estos vectores de direccionamiento se construyeron para incluir una secuencia genómica κ humana de ~23 kb localizada de forma natural entre los segmentos génicos V κ 4-1 y J κ 1 humanos. Esta secuencia genómica κ humana se posicionó específicamente en estos dos vectores de direccionamiento adicionales entre los segmentos génicos V λ humano y J λ humano (Fig. 4B. Vectores de direccionamiento 12(κ)1- κ y 12 (κ)4- κ).

Ambos vectores de direccionamiento que contenían la secuencia genómica κ humana se prepararon usando el clon BAC RP11-729g4 modificado descrito anteriormente (Fig. 6). Este clon BAC modificado se abordó con un casete de selección de espectinomicina flanqueado por sitios de restricción NotI y AsiSI (Fig. 6, superior izquierda). La recombinación homóloga con el casete de espectinomicina produjo un clon BAC 729g4 doblemente abordado que incluía de 5' a 3', un sitio I-Ceul, un sitio Frt 5', un casete de neomicina, un sitio Frt 3', un fragmento de ~123 kb que contenía los 12 primeros segmentos génicos hV λ , un sitio NotI aproximadamente 200 pb cadena abajo (3') a la secuencia noamérica del segmento génico hV λ 3-1, un casete de espectinomicina y un sitio AsiSI. Se abordó un clon BAC humano diferente que contenía la secuencia κ humana (CTD-2366j12) dos veces independientes para diseñar sitios de restricción en localizaciones entre los segmentos génicos hV κ 4-1 y hJ κ 1 para permitir la posterior clonación de un fragmento de ~23 kb para el ligamiento con los segmentos génicos hV λ contenidos en el clon BAC 729g4 modificado doblemente abordado (Fig. 6, superior derecha).

En resumen, el clon BAC 2366j12 es de aproximadamente 132 kb de tamaño y contiene los segmentos génicos hV κ 1-6, 1-5, 2-4, 7-3, 5-2, 4-1, la secuencia genómica κ humana cadena abajo de los segmentos génicos V κ , los segmentos génicos hJ κ 1-5, el hC κ y aproximadamente 20 kb de secuencia genómica adicional del locus κ humano. Este clon primero se abordó con un vector de direccionamiento que contenía un casete de higromicina flanqueado por sitios Frt y un sitio NotI cadena abajo (3') del sitio Frt 3'. Los brazos de homología para este vector de direccionamiento contenían la secuencia genómica humana 5' y 3' de los segmentos génicos V κ dentro del clon BAC de modo que, tras recombinación homóloga con este vector de direccionamiento, se delecionaran los segmentos génicos V κ y se diseñó un sitio NotI ~133 pb cadena abajo del segmento génico hV κ 4-1 (Fig. 6, superior derecha). Este clon BAC 2366j12 modificado se abordó independientemente con dos vectores de direccionamiento en el extremo 3' para delecionar los segmentos génicos hJ κ con un casete de cloranfenicol que también contenía un segmento génico hJ λ 1, un sitio PI-Scel y un sitio AsiSI o un fragmento genómico λ humano que contenía cuatro segmentos génicos hJ λ (*supra*), un sitio PI-Scel y un sitio AsiSI (Fig. 6, superior derecha). Los brazos de homología para estos dos vectores de direccionamiento similares contenían la secuencia 5' y 3' de los segmentos génicos hJ κ . La recombinación homóloga con estos segundos vectores de direccionamiento y el clon BAC 2366j12 modificado produjo un clon 2366j12 doblemente abordado que incluía, de 5' a 3', un sitio Frt 5', un casete de higromicina, un sitio Frt 3', un sitio NotI, un fragmento genómico de 22.800 pb del locus κ humano que contenía la región intergénica entre los segmentos génicos V κ 4-1 y J κ 1, un segmento génico hJ λ 1 o un fragmento genómico λ humano que contenía hJ λ 1, J λ 2, J λ 3 y J λ 7, un sitio PI-Scel y un casete de cloranfenicol (Fig. 6, superior derecha). Se consiguieron dos vectores de direccionamiento finales para hacer las dos modificaciones adicionales mediante dos etapas de ligamiento usando los clones doblemente abordados 729g4 y 2366j12.

Se digirieron los clones 729g4 y 2366j12 doblemente abordados con NotI y AsiSI produciendo un fragmento que contenía el casete de neomicina y los segmentos génicos hV λ y otro fragmento que contenía el fragmento genómico

de ~23 kb del locus κ humano que contenía la región intergénica entre los segmentos génicos $V\kappa 4-1$ y $J\kappa 1$, un segmento génico $hJ\lambda 1$ o un fragmento genómico que contenía los segmentos génicos $hJ\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$ y $J\lambda 7$, el sitio $PI-SceI$ y el casete de cloranfenicol respectivamente. El ligamiento de estos fragmentos generó dos clones BAC únicos que contenían de 5' a 3' los segmentos génicos $hV\lambda$, la secuencia genómica κ humana entre los segmentos génicos $V\kappa 4-1$ y $J\kappa 1$, un segmento génico $hJ\lambda 1$ o un fragmento genómico que contenía los segmentos génicos $hJ\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$ y $J\lambda 7$, un sitio $PI-SceI$ y un casete de cloranfenicol (Fig. 6, parte inferior). Estos nuevos clones BAC después se digirieron con $I-CeuI$ y $PI-SceI$ para liberar los fragmentos únicos que contenían el casete de neomicina cadena arriba y las secuencias λ y κ humanas contiguas y se ligaron en un clon BAC de ratón modificado 302g12 que contenía de 5' a 3' la secuencia genómica de ratón 5' del locus κ endógeno, un sitio $I-CeuI$, un sitio $Fr t 5'$, un casete de neomicina, un sitio $Fr t 3'$, los segmentos génicos $hV\lambda$ (3-12 a 3-1), un sitio $NotI$ ~200 pb cadena abajo de $V\lambda 3-1$, -23 kb de la secuencia κ humana encontrada de forma natural entre los segmentos génicos $V\kappa 4-1$ y $J\kappa 1$ humanos, un segmento génico $hJ\lambda 1$ o un fragmento genómico que contenía los segmentos génicos $hJ\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$ y $J\lambda 7$, el $E\kappa i$ de ratón, el gen $C\kappa$ de ratón y $E\kappa 3'$ (Fig. 4, vectores de direccionamiento 12hV λ - $V\kappa J\kappa$ - $hJ\lambda 1$ y 12hV λ - $V\kappa J\kappa$ -4hJ λ). La recombinación homóloga con estos dos vectores de direccionamiento creó dos loci de cadena ligera κ de ratón modificados diferentes que contenían 12 segmentos génicos $hV\lambda$, la secuencia genómica κ humana, y uno o cuatro segmentos génicos $hJ\lambda$ unidos de forma funcional al gen $C\kappa$ de ratón endógeno que, tras recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera quimérica λ humana/ κ de ratón.

Ejemplo III

Diseño por ingeniería de segmentos génicos $V\lambda$ humanos adicionales en un mini-locus de cadena ligera λ humana

Se añadieron segmentos génicos $hV\lambda$ adicionales independientemente a cada una de las modificaciones iniciales descritas en el Ejemplo 2 usando vectores de direccionamiento y métodos similares (FIG. 5A, vector de direccionamiento +16- λ y FIG. 5B, vector de direccionamiento +16- κ).

Introducción de 16 segmentos génicos $V\lambda$ humanos adicionales. Los brazos de homología cadena arriba (5') usados en la construcción de vectores de direccionamiento para añadir 16 segmentos génicos $hV\lambda$ adicionales a los loci de cadena ligera modificados descritos en el Ejemplo 2 contenían la secuencia genómica de ratón 5' de cualquiera de los loci de cadena ligera κ o λ endógenos. Los brazos de homología 3' eran iguales para todos los vectores de direccionamiento y contenían la secuencia genómica humana solapante con el extremo 5' de la secuencia λ humana de las modificaciones descritas en el Ejemplo 2.

En resumen, se diseñaron dos vectores de direccionamiento para la introducción de 16 segmentos génicos $hV\lambda$ adicionales en los loci de cadena ligera de ratón modificados descritos en el Ejemplo 2 (FIG. 5A y 5B, vector de direccionamiento +16- λ o +16- κ). Se diseñó un fragmento de ADN de -172 kb del clon BAC humano RP11-761113 (Invitrogen) que contenía 21 segmentos génicos $hV\lambda$ consecutivos del grupo A con un brazo de homología 5' que contenía la secuencia genómica de ratón 5' a cualquiera de los loci de cadena ligera κ o λ endógenos y un brazo de homología 3' que contenía la secuencia λ genómica humana. Los brazos de homología κ o λ de ratón 5' usados en estas construcciones de direccionamiento eran los mismos brazos de homología 5' descritos en el Ejemplo 2 (FIG. 5A y 5B). El brazo de homología 3' incluía un solapamiento de 53.057 pb de la secuencia λ genómica humana correspondiente al extremo 5' equivalente del fragmento de aproximadamente 123 kb de la secuencia λ genómica humana descrita en el Ejemplo 2. Estos dos vectores de direccionamiento incluían, de 5' a 3', un brazo de homología de ratón 5' que contenía ~23 kb de la secuencia genómica 5' del locus de cadena ligera κ de ratón endógeno o -24 kb de la secuencia genómica de ratón 5' del locus de cadena ligera λ endógeno, un sitio $Fr t 5'$, un casete de higromicina, un sitio $Fr t 3'$ y 171.457 pb de la secuencia λ genómica humana que contenía 21 segmentos génicos $hV\lambda$ consecutivos, ~53 kb de los cuales solapan con el extremo 5' de la secuencia λ humana descrita en el Ejemplo 3 y sirve como brazo de homología 3' para esta construcción de direccionamiento (FIG. 5A y 5B, vectores de direccionamiento +16- λ o +16- κ). La recombinación homóloga con estos vectores de direccionamiento creó loci de cadena ligera κ y λ de ratón modificados independientemente que contenían cada uno 28 segmentos génicos $hV\lambda$ y un segmento génico $hJ\lambda 1$ unidos de forma funcional a genes constantes de ratón endógenos ($C\kappa$ o $C\lambda 2$) que, tras la recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera quimérica.

De un modo similar, también se usó el vector de direccionamiento +16- κ para introducir los 16 segmentos génicos $hV\lambda$ adicionales a las otras modificaciones iniciales descritas en el Ejemplo 2 que incorporaban múltiples segmentos génicos $hJ\lambda$ con y sin una secuencia κ humana integrada (FIG. 4B). La recombinación homóloga con este vector de direccionamiento en el locus κ de ratón endógeno que contenía las otras modificaciones iniciales creó loci de cadena ligera κ de ratón que contenían 28 segmentos génicos $hV\lambda$ y los segmentos génicos $hJ\lambda 1$, 2, 3 y 7 con y sin una secuencia genómica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana unida de forma funcional al gen $C\kappa$ de ratón endógeno que, tras la recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera λ - κ quimérica.

Introducción de 12 segmentos génicos $V\lambda$ humanos adicionales. Se añadieron segmentos génicos $hV\lambda$ adicionales independientemente a cada una de las modificaciones descritas anteriormente usando vectores de direccionamiento y métodos similares. La estructura final del locus resultante de la recombinación homóloga con vectores de direccionamiento que contenían segmentos génicos $hV\lambda$ adicionales se muestra en la FIG. 7A y 7B.

En resumen, se diseñó un vector de direccionamiento para la introducción de 12 segmentos génicos hVλ adicionales a los loci de cadena ligera κ y λ de ratón modificados descritos anteriormente (FIG. 5A y 5B, vectores de direccionamiento +12-λ o +12-κ). Se diseñó un fragmento de ADN de 93.674 pb del clon BAC humano RP11-22118 (Invitrogen) que contenía 12 segmentos génicos hVλ consecutivos del grupo B con un brazo de homología 5' que contenía la secuencia genómica de ratón 5' a cualquiera de los loci de cadena ligera κ o λ de ratón endógenos y un brazo de homología 3' que contenía la secuencia λ genómica humana. Los brazos de homología 5' usados en esta construcción de direccionamiento eran los mismos brazos de homología 5' usados para la adición de 16 segmentos génicos hVλ descritos anteriormente (FIG. 5A y 5B). El brazo de homología 3' se preparó diseñando un sitio PI-SceI ~3431 pb 5' al segmento génico Vλ3-29P humano contenido en un fragmento genómico de 27.468 pb de la secuencia λ humana del clon BAC RP11-761113. Este sitio PI-SceI sirvió como punto de ligamiento para unir el fragmento de ~94 kb de la secuencia λ humana adicional al fragmento de -27 kb de la secuencia λ humana que solapa con el extremo 5' de la secuencia λ humana en la modificación previa usando los vectores de direccionamiento +16-λ o +16-κ (FIG. 5A y 5B). Estos dos vectores de direccionamiento incluían, de 5' a 3', un brazo de homología 5' que contenía -23 kb de la secuencia genómica de ratón 5' del locus de cadena ligera κ endógeno o -24 kb de la secuencia genómica de ratón 5' del locus de cadena ligera λ endógeno, un sitio Frt 5', un casete de neomicina, un sitio Frt 3' y 121.188 pb de la secuencia λ genómica humana que contenía 16 segmentos génicos hVλ y un sitio PI-SceI, -27 kb de los cuales solapan con el extremo 5' de la secuencia λ humana desde la inserción de 16 segmentos génicos hVλ adicionales y sirve como brazo de homología 3' para esta construcción de direccionamiento (FIG. 5A y 5B, vectores de direccionamiento +12-λ o +12-κ). La recombinación homóloga con estos vectores de direccionamiento creó independientemente loci de cadena ligera κ y λ de ratón modificados que contenían 40 segmentos génicos hVλ y Jλ1 humano unido de forma funcional a los genes constantes de ratón endógenos (Cκ o Cλ2) que, tras la recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera quimérica (parte inferior de la FIG. 5A y 5B).

De un modo similar, también se usó el vector de direccionamiento +12κ para introducir los 12 segmentos génicos hVλ adicionales a las otras modificaciones iniciales que incorporaban múltiples segmentos génicos hJλ con y sin una secuencia κ humana integrada (FIG. 4B). La recombinación homóloga con este vector de direccionamiento en el locus κ de ratón endógeno que contenía las otras modificaciones creó un locus de cadena ligera κ de ratón que contenía 40 segmentos génicos hVλ y los segmentos génicos hJλ1, 2, 3 y 7 con y sin una secuencia genómica Vκ-Jκ humana unida de forma funcional al gen Cκ de ratón endógeno que, tras la recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera λ-κ quimérica.

Ejemplo IV

35 Identificación de células ES abordadas que albergan segmentos génicos de cadena ligera λ humana

Se usó el ADN de BAC abordado preparado de acuerdo con los Ejemplos anteriores para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas para generar ratones quiméricos que expresen segmentos génicos de cadena ligera λ humana. Se identificaron células ES que contenían una inserción de segmentos génicos de cadena ligera λ humana no reordenados por un ensayo TAQMAN® cuantitativo. Se diseñaron conjuntos de cebadores específicos y sondas para la inserción de secuencias λ humanas y se asociaron casetes de selección (ganancia de alelo, GOA), pérdida de secuencias endógenas de ratón y cualquier casete de selección (pérdida de alelo, LOA) y retención de secuencias de ratón flanqueantes (retención de alelo, AR). Para cada inserción adicional de secuencias λ humanas, se usaron conjuntos de cebadores y sondas adicionales para confirmar la presencia de las secuencias λ humanas adicionales, así como los conjuntos de cebadores y sondas previos usados para confirmar la retención de las secuencias humanas previamente abordadas. La Tabla 1 expone los cebadores y sondas asociadas usados en los ensayos de PCR cuantitativa. La Tabla 2 expone las combinaciones usadas para confirmar la inserción de cada sección de segmentos génicos de cadena ligera λ humana en clones de células ES.

Las células ES que albergan los segmentos génicos de cadena ligera λ humana se transfectan opcionalmente con una construcción que expresa FLP para retirar el casete de neomicina flanqueado por Frt introducido mediante la inserción de la construcción de direccionamiento que contiene los segmentos génicos Vλ5-52 - Vλ1-40 humanos (FIG. 5A y 5B). El casete de neomicina puede retirarse opcionalmente cruzándolos con ratones que expresan FLP recombinasa (por ejemplo, documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina se retiene en los ratones.

Tabla 1

Cebador	SEQ ID NO:	Sonda	SEQ ID NO:
hL2F	2	hL2P	24
hL2R	3		
hL3F	4	hL3P	25
hL3R	5		
NeoF	6	NeoP	26
NeoR	7		

Cebador	SEQ ID NO:	Sonda	SEQ ID NO:
61hJ1F	8	61hJ1P	27
61hJ1R	9		
67hT1F	10	67hT1P	28
67hT1R	11		
67hT3F	12	67hT3P	29
67hT3R	13		
HygF	14	HygP	30
HygR	15		
MKD2F	16	MKD2P	31
MKD2R	17		
MKP8F	18	MKP8P	32
MKP8R	19		
MKP15F	20	MKP15P	33
MKP15R	21		
MK20F	22	-	-
MKP4R	23		
68h2F	34	68h2P	38
68h2R	35		
68h5F	36	68h5P	39
68h5R	37		
mL1F	75	mL1P	83
mL1R	76		
mL2F	77	mL2P	84
mL2R	78		
mL11F	79	mL11P	85
mL11R	80		
mL12F	81	mL12P	86
mL12R	82		

Tabla 2

Modificación	Ensayo	Conjunto de cebador directo/inverso	Sonda	Localización de secuencia
Inserción de 12 hVλ y hJλ 1	GOA	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12- hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		61hJ1F/61hJ1R	61hJ1P	secuencia hJλ
		NeoF/NeoR	NeoP	Casete de neomicina
	LOA	MK20F/MKP4R	-	Secuencia <i>lox511/loxP</i> de locus κ inactivado
		HygF/HygR	HygP	Casete de higromicina de locus λ inactivado
		mL1F/mL1R	mL1P	Grupo Vλ1-CA1 de ratón
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11 F/mL11 R	mL11P	Grupo Vλ2-CA2 de ratón
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Secuencia de ratón en el locus Vκ 5'
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Secuencia de ratón en el locus Vκ 3'
Inserción de 16 hVλ	GOA	67hT1 F/67hT1 R	67hT1P	hVλ3-27 - hVλ3-12
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	
		HygF/HygR	HygP	Casete de higromicina
	LOA	NeoF/NeoR	NeoP	Casete de neomicina
		mL1 F/mL1 R	mL1P	Grupo Vλ1-CA1 de ratón
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Grupo Vλ2-CA2 de ratón
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12-hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Secuencia de ratón en el locus Vκ 5'
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Secuencia de ratón en el locus Vκ 3'

Modificación	Ensayo	Conjunto de cavador directo/inverso	Sonda	Localización de secuencia
Inserción de 12 hVλ	GOA	68h2F/68h2R	68h2P	hVλ5-52-hVλ1-40
		68h5F/68h5R	68h5P	
		NeoF/NeoR	NeoP	Casete de neomicina
	LOA	HygF/HygR	HygP	Casete de higromicina
		mL1F/mL1R	mL1P	Grupo Vλ1-Cλ1 de ratón
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Grupo Vλ2-Cλ2 de ratón
	mL12F/mL12R	mL12P		
	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12-hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		67hT1F/67hT1R	67hT1P	hVλ3-27- hVλ3-12
	67hT3F/67hT3R	67hT3P		
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Secuencia de ratón en el locus Vκ 5'
MKP15F/MKP15R		MKP15P	Secuencia de ratón en el locus Vκ 3'	

Ejemplo V

5 Generación de ratones que expresan cadenas ligeras λ humanas a partir de un locus de cadena ligera endógeno

Se usaron células ES abordadas descritas anteriormente como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en fase de 8-células por el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.294.754 y Poueymirou et al. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1):91-99). VELOCIMICE® (ratones F0 obtenidos completamente de la célula Es donante) que albergaban independientemente segmentos génicos λ humanos se identificaron por genotipado usando una modificación del ensayo de alelo (Valenzuela et al., supra) que detectaba la presencia de los segmentos génicos λ humanos únicos (supra).

Uso de cadena ligera κ:λ de ratones que albergan segmentos génicos de cadena ligera λ humana. Se analizaron ratones homocigóticos para cada una de las tres inserciones sucesivas de segmentos génicos hVλ con un único segmento génico hJλ (FIG. 5B) y ratones homocigóticos para una primera inserción de segmentos génicos hVλ con un único segmento génico hJλ o cuatro segmentos génicos Jλ humanos que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (FIG. 4B) para la expresión de la cadena ligera κ y λ en esplenocitos usando citometría de flujo.

En resumen, se recogieron bazos de grupos de ratones (que variaban de 3 a 7 animales por grupo) y se trituraron usando portaobjetos de vidrio. Después de la lisis de los glóbulos rojos (RBC) con tampón de lisis ACK (Lonza Walkersville), se tiñeron los esplenocitos con anticuerpos conjugados con colorante fluorescente específicos para CD19 de ratón (clon 1 D3; BD Biosciences), CD3 de ratón (17A2; Biolegend), Igκ de ratón (187.1; BD Biosciences) e Igλ de ratón (RML-42; Biolegend). Los datos se adquirieron un citómetro de flujo BD™ LSR II (BD Biosciences) y se analizaron usando el software FLOWJO™ (Tree Star, Inc.). La Tabla 3 expone los valores porcentuales promedio para la expresión de células B (CD19⁺), cadena ligera κ (CD19⁺Igκ⁺Igλ⁻) y cadena ligera λ (CD19⁺Igκ⁻Igλ⁺) observada en esplenocitos de grupos de animales que albergan cada modificación genética.

En un experimento similar, se analizaron los contenidos de células B del compartimento esplénico de ratones homocigóticos para una primera inserción de 12 segmentos génicos hVλ y 4 hJλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana unida de forma funcional al gen Cκ de ratón (parte inferior de la FIG. 4B) y ratones homocigóticos para 40 segmentos génicos hVλ y 1 hJλ (parte inferior de la FIG. 5B o parte superior de la FIG. 7B) para la expresión de Igκ e Igλ usando citometría de flujo (como se ha descrito anteriormente). La FIG. 8A muestra la expresión de Igλ e Igκ en células B CD19⁺ para un ratón representativo de cada grupo. La cantidad de células B CD19⁺ por bazo también se registró para cada ratón (FIG. 8B).

En otro experimento, se analizaron los contenidos de células B de los compartimentos de bazo y médula ósea de ratones homocigóticos para 40 segmentos génicos hVλ y 4 hJλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana unida de forma funcional al gen Cκ de ratón (parte inferior de la FIG. 7B) para la progresión a través del desarrollo de células B usando citometría de flujo de diversos marcadores de superficie celular.

En resumen, se sacrificaron dos grupos (N=3 cada uno, 9-12 semanas de edad, machos y hembras) de ratones de tipo silvestre y homocigóticos para 40 segmentos génicos hVλ y 4 hJλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana unida de forma funcional al gen Cκ de ratón y se recogieron los bazos y la médula ósea. La médula ósea se recogió de los fémures por lavado abundante con medio RPMI completo (medio RPMI suplementado con suero de ternera fetal, piruvato sódico, Hepes, 2-mercaptoetanol, aminoácidos no esenciales, y gentamicina). Se lisaron las

RBC de preparaciones de bazo y médula ósea con tampón de lisis ACK (Lonza Walkersville), seguido por lavado con medio RPMI completo. Se incubaron 1×10^6 células con anticuerpo anti-CD16/CD32 de ratón (2.4G2, BD Biosciences) en hielo durante 10 minutos, seguido por marcaje con un panel de anticuerpos seleccionados durante 30 minutos en hielo.

5 Panel de médula ósea: anticuerpo anti-FITC-CD43 de ratón (1B11, BioLegend), PE-ckit (2B8, BioLegend), PeCy7-IgM (II/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-IgD (11-26c.2a, BioLegend), APC-B220 (RA3-6B2, eBioscience), APC-H7-CD19 (ID3, BD) y Pacific Blue-CD3 (17A2, BioLegend).

10 Panel de médula ósea y bazo: anticuerpo anti-FITC-Igk de ratón (187.1, BD), PE-Igλ (RML-42, BioLegend), PeCy7-IgM (II/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-IgD (11-26c.2a, BioLegend), Pacific Blue-CD3 (17A2, BioLegend), APC-B220 (RA3-6B2, eBioscience), APC-H7-CD19 (ID3, BD).

15 Después de la tinción, las células se lavaron y fijaron en formaldehído al 2 %. La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo FACSCANTOII™ (BD Biosciences) y se analizaron con el software FLOWJO™ (Tree Star, Inc.). Las FIG. 9A - 9D muestran los resultados para el compartimento esplénico de un ratón representativo de cada grupo. Las FIG. 10A - 10 E muestran los resultados para el compartimento de médula ósea de un ratón representativo de cada grupo. La Tabla 4 expone los valores porcentuales promedio para la expresión de células B (CD19⁺), cadena ligera κ (CD19⁺Igk⁺Igλ⁻)□ y cadena ligera λ (CD19⁺Igk⁻Igλ⁺) observada en esplenocitos de grupos de animales que albergan diversas modificaciones genéticas. La Tabla 5 expone los valores porcentuales promedio para las células B (CD19⁺), células B maduras (B220^{int}IgM⁺), células B inmaduras (B220^{int}IgM⁺), células B inmaduras que expresan cadena ligera κ (B220^{int}IgM⁺Igk⁺) y células B inmaduras que expresan cadena ligera λ (B220^{int}IgM⁺Igλ⁺) observadas en médula ósea de ratones de tipo silvestre y homocigóticos para 40 segmentos génicos hVλ y 4 hJλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana unida de forma funcional al gen Cκ de ratón. Este experimento se repitió con grupos adicionales de los ratones descritos anteriormente y demostró resultados similares (datos no mostrados).

Tabla 3

Genotipo	% células B	% Igk ⁺	% Igλ ⁺
Tipo silvestre	46,2	91,0	3,6
12 hVλ+hJλ1	28,3	10,4	62,5
12 hVλ-VκJκ-hJλ1	12,0	11,0	67,5
12 hVλ-VκJκ-4hJλ	41,8	17,2	68,4
28 hVλ+hJλ1	22,0	13,3	51,1
40 hVλ+hJλ1	28,2	24,3	53,0

30

Tabla 4

Genotipo	% células B	% Igk ⁺	% Igλ ⁺
Tipo silvestre	49,8	91,2	3,5
40 hVλ-VκJκ-4hJλ	33,3	41,6	43,1

Tabla 5

Genotipo	% células B	% células B maduras	% células B inmaduras	% células B Inmaduras Igk ⁺	% células B inmaduras Igλ ⁺
Tipo silvestre	62,2	9,2	12,0	79,0	8,84
40hVλ-VκJκ-4hJλ	60,43	2,59	7,69	38,29	43,29

35 **Uso del gen Vλ humano en ratones que albergan segmentos génicos de cadena ligera λ humana.** Se analizaron ratones heterocigóticos para una primera inserción de secuencias λ humanas (hVλ3-12 - hVλ3-1 y hJλ1, FIG. 5B) y homocigóticos para una tercera inserción de secuencias λ humanas (hVλ5-52 - hVλ3-1 y hJλ1, FIG. 5B) para el uso del gen de cadena ligera λ humana por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) usando el ARN aislado de esplenocitos.

40 En resumen, se recogieron los bazos y se perfundieron con 10 ml de RPMI-1640 (Sigma) con HI-FBS al 5 % en bolsas desechables estériles. Cada bolsa que contenía un único bazo después se colocó en un STOMACHER™ (Seward) y se homogeneizó en un ajuste medio durante 30 segundos. Los bazos homogeneizados se filtraron usando un filtro celular de 0,7 μm y después se sedimentaron con una centrifuga (1000 rpm durante 10 minutos) y se lisaron las RBC en BD PHARM LYSE™ (BD Biosciences) durante tres minutos. Los esplenocitos se diluyeron con RPMI-1640 y se centrifugaron de nuevo, seguido por resuspensión en 1 ml de PBS (Irvine Scientific). El ARN se aisló de esplenocitos sedimentados usando técnicas convencionales conocidas en la técnica.

50 Se realizó RT-PCR sobre el ARN de esplenocitos usando cebadores específicos para los segmentos génicos hVλ humanos y el gen Cκ de ratón (Tabla 6). Los productos de PCR se purificaron del gel y se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO TA (Invitrogen) y se secuenciaron con los cebadores M13 directo (GTAAAACGACGGCCAG; SEQ ID NO: 55) y M13 inverso (CAGGAAACAGCTATGAC; SEQ ID NO:56) localizados dentro del vector en localizaciones

que flanquean el sitio de clonación. Se secuenciaron ochenta y cuatro clones totales derivados de la primera y tercera inserción de secuencias λ humanas para determinar el uso del gen hV λ (Tabla 7). La secuencia de nucleótidos de la unión hV λ -hJ λ 1-mC κ para clones de RT-PCR seleccionados se muestra en la FIG. 11.

5 De un modo similar, se analizaron ratones homocigóticos para una tercera inserción de secuencias génicas de cadena ligera λ humana (es decir, 40 segmentos génicos hV λ y 4 segmentos génicos hJ λ incluyendo una secuencia genómica Vk-Jk humana, parte inferior de la FIG. 7B) unidos de forma funcional al gen C κ de ratón endógeno para el uso del gen de cadena ligera λ humana por RT-PCR usando el ARN aislado de esplenocitos (como se ha descrito anteriormente). El uso del segmento génico de cadena ligera λ humana para 26 clones de RT-PCR seleccionados se muestra en la Tabla 8. La secuencia de nucleótidos de la unión hV λ -hJ λ -mC κ para los clones RT-PCR seleccionados se muestra en la FIG. 12.

15 De un modo similar, se analizaron ratones homocigóticos para una primera inserción de los segmentos génicos de cadena ligera λ humana (12 segmentos génicos hV λ y hJ λ 1, FIG. 4A y FIG. 5B) unidos de forma funcional al gen C λ 2 de ratón endógeno para el uso del gen de cadena ligera λ humana por RT-PCR usando el ARN aislado de esplenocitos (como se ha descrito anteriormente). Los cebadores específicos para los segmentos génicos hV λ (Tabla 6) se emparejaron con uno de dos cebadores específicos para el gen C λ 2 de ratón; C λ 2-1 (SEQ ID NO:104) o C λ 2-2 (SEQ ID NO:105).

20 Se observaron múltiples segmentos génicos hV λ reordenados en h λ 1 de los clones de RT-PCR de ratones que albergaban segmentos génicos de cadena ligera λ humana en el locus de cadena ligera λ de ratón endógeno. La secuencia de nucleótidos de la unión hV λ -hJ λ -mC λ 2 para los clones de RT-PCR seleccionados se muestra en la FIG. 13.

25

Tabla 6

Cebador de hVλ 5'	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
VLL-1	CCTCTCCTCC TCACCCTCCT	40
VLL-1n	ATGRCCDGST YYYCTCTCCT	41
VLL-2	CTCCTCACTC AGGGCACA	42
VLL-2n	ATGGCCTGGG CTCTGCTSCT	43
VLL-3	ATGGCCTGGA YCSTCTCC	44
VLL-4	TCACCATGGC YTGGRYCYCM YTC	45
VLL-4.3	TCACCATGGC CTGGGTCTCC TT	46
VLL-5	TCACCATGGC CTGGAMTCYT CT	47
VLL-6	TCACCATGGC CTGGGCTCCA CTACTT	48
VLL-7	TCACCATGGC CTGGACTCCT	49
VLL-8	TCACCATGGC CTGGATGATG CTT	50
VLL-9	TAAATATGGC CTGGGCTCCT CT	51
VLL-10	TCACCATGCC CTGGGCTCTG CT	52
VLL-11	TCACCATGGC CCTGACTCCT CT	53
Cebador de Cκ de ratón 3'	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
mI μ KC3'-1	CCCAAGCTTA CTGGATGGTG GGAAGATGGA	54

Tabla 7

hVλ	N.º observado de clones
3-1	2
4-3	3
2-8	7
3-9	4
3-10	3
2-14	1
3-19	1
2-23	7
3-25	1
1-40	9
7-43	2
1-44	2
5-45	8
7-46	3
9-49	6
1-51	3

Tabla 8

Clon	hV λ	hJ λ
1-3	1-44	7
1-5	1-51	3
2-3	9-49	7
2-5	1-40	1
2-6	1-40	7
3b-5	3-1	7
4a-1	4-3	7
4a-5	4-3	7
4b-1	1-47	3
5-1	3-10	3
5-2	1-40	7
5-3	1-40	7
5-4	7-46	2
5-6	1-40	7
5-7	7-43	3
6-1	1-40	1
6-2	1-40	2
6-7	1-40	3
7a-1	3-10	7
7a-2	9-49	2
7a-7	3-10	7
7b-2	7-43	3
7b-7	7-46	7
7b-8	7-43	3
11 a-1	5-45	2
11 a-2	5-45	7

La FIG. 11 muestra la secuencia de la unión hV λ -hJ λ 1-mC κ para clones de RT-PCR de ratones que albergan una primera y tercera inserción de segmentos génicos hV λ con un único segmento génico hJ λ . Las secuencias mostradas en la FIG. 11 ilustran reordenamientos únicos que implican diferentes segmentos génicos hV λ con hJ λ 1 recombinado con el gen C κ de ratón. Ratones heterocigóticos que albergaban un único locus κ endógeno modificado que contenía 12 segmentos génicos hV λ y hJ λ 1 y ratones homocigóticos que albergaban 2 loci κ endógenos modificados que contenían 40 segmentos génicos hV λ y hJ λ 1 eran ambos capaces de producir segmentos génicos λ humanos unidos de forma funcional al gen C κ de ratón y producir células B que expresaban cadenas ligeras λ humanas. Estos reordenamientos demuestran que los loci quiméricos eran capaces de reordenar independientemente segmentos génicos λ humanos en múltiples células B independientes en estos ratones. Además, estas modificaciones en el locus de cadena ligera κ endógeno no volvían a ningún segmento génico hV λ no funcional o evitaban que el locus quimérico recombinara con múltiples hV λ y un segmento génico hJ λ (J λ 1) durante el desarrollo de células B como se evidencia por los 16 segmentos génicos hV λ diferentes que se observó que se reordenaban con hJ λ 1 (Tabla 7). Además, estos ratones generaron anticuerpos funcionales que contenían segmentos génicos V λ -J λ humanos reordenados unidos de forma funcional a genes C κ de ratón como parte del repertorio de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno.

La FIG. 12 muestra la secuencia de la unión hV λ -hJ λ -mC κ para clones de RT-PCR seleccionados de ratones homocigóticos para 40 segmentos génicos hV λ y 4 hJ λ incluyendo una secuencia genómica V κ -J κ humana. Las secuencias mostradas en la FIG. 12 ilustran reordenamientos únicos adicionales que implican múltiples segmentos génicos hV λ diferentes, que abarcan el locus quimérico completo, con múltiples segmentos génicos hJ λ diferentes reordenados y unidos de forma funcional al gen C κ de ratón. Ratones homocigóticos que albergan loci κ endógenos modificados que contenían 40 segmentos génicos hV λ y 4 hJ λ también eran capaces de producir segmentos génicos λ humanos unidos de forma funcional al gen C κ de ratón y producir células B que expresaban cadenas ligeras λ humanas. Estos reordenamientos demuestran adicionalmente que todas las fases de los loci quiméricos eran capaces de reordenar independientemente segmentos génicos λ humanos en múltiples células B independientes en estos ratones. Además, estas modificaciones adicionales al locus de cadena ligera κ endógeno demuestran que cada inserción de segmentos génicos λ humanos no vuelven a ningunos de los segmentos génicos hV λ y/o J λ no funcionales o evitan que el locus quimérico recombine los segmentos hV λ y J λ durante el desarrollo de células B como se evidencia por 12 segmentos génicos hV λ diferentes que se observó que se reordenaban con los 4 segmentos génicos hJ λ (Tabla 8) de los 26 clones de RT-PCR seleccionados. Además, estos ratones también generaron anticuerpos funcionales que contenían segmentos génicos V λ -J λ humanos unidos de forma funcional a regiones C κ de ratón como parte del repertorio de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno.

La FIG. 13 muestra la secuencia de la unión hV λ -hJ λ -mC λ 2 para tres clones de RT-PCR individuales de ratones homocigóticos para 12 segmentos génicos hV λ y hJ λ 1. Las secuencias mostradas en la FIG. 13 ilustran

reordenamientos únicos adicionales que implican diferentes segmentos génicos hVλ, que abarcan la longitud de la primera inserción, con hJλ1 reordenado y unido de forma funcional al gen Cλ2 de ratón (2D1 = Vλ2-8Jλ1; 2D9 = Vλ3-10Jλ1; 3E15 = Vλ3-1Jλ1). Un clon demostró un reordenamiento no productivo debido a adiciones N en la unión hVλ-hJλ (2D1, FIG. 13). Esto no es infrecuente en la recombinación V(D)J, ya que la unión de segmentos génicos durante la recombinación ha demostrado ser imprecisa. Aunque este clon representa un recombinante no productivo presente en el repertorio de cadena ligera de estos ratones, demuestra que el mecanismo genético que contribuye a la diversidad de unión entre genes de anticuerpo está funcionando de forma normal en estos ratones y conduciendo a un repertorio de anticuerpos que contiene cadenas ligeras con mayor diversidad.

Ratones homocigóticos que albergan loci λ endógenos modificados que contienen 12 segmentos génicos hVλ y hJλ1 también eran capaces de producir segmentos génicos λ humanos unidos de forma funcional a un gen Cλ de ratón endógeno y producir células B que expresaban cadenas ligeras λ quiméricas inversas que contenían regiones hVλ unidas a regiones Cλ de ratón. Estos reordenamientos demuestran adicionalmente que segmentos génicos de cadena ligera λ humana colocados en el otro locus de cadena ligera (es decir, el locus λ) eran capaces de reordenar independientemente segmentos génicos λ humanos en múltiples células B independientes en estos ratones. Además, las modificaciones al locus de cadena ligera λ endógeno demuestran que la inserción de segmentos génicos λ humanos no volvían a ninguno de los segmentos génicos hVλ y/o hJλ1 no funcionales o evitaban que el locus quimérico recombinara los segmentos génicos hVλ y hJλ1 durante el desarrollo de células B. Además, estos ratones también generaron anticuerpos funcionales que contenían segmentos génicos Vλ-Jλ humanos unidos de forma funcional a una región Cλ de ratón como parte del repertorio de cadena ligera de inmunoglobulina endógena.

Como se muestra en este Ejemplo, ratones que albergaban segmentos génicos de cadena ligera λ humana en los loci de cadena ligera κ y λ endógenos eran capaces de reordenar segmentos génicos de cadena ligera λ humana y de expresarlos en el contexto de una región Cκ y/o Cλ de ratón como parte del repertorio de anticuerpo normal del ratón porque se requería una cadena ligera funcional en diversos puntos de control en el desarrollo de células B tanto en el bazo como en médula ósea. Además, subconjuntos prematuros de células B (por ejemplo, células pre B, pro B y B transicionales) demuestran un fenotipo normal en estos ratones en comparación con compañeros de camada de tipo silvestre (FIG. 9D, 10A y 10B). Se observó un pequeño déficit en poblaciones de células B de médula ósea y periféricas, que puede atribuirse a una delección de un subconjunto de células B inmaduras auto-reactivas y/o una asociación subóptima de cadena ligera λ humana con cadena pesada de ratón. Sin embargo, el uso Igκ/Igλ observado en estos ratones demuestra una situación que es más similar a la expresión de cadena ligera humana que la observada en ratones.

Ejemplo VI

Cruce de ratones que expresan cadenas ligeras λ humanas a partir de un locus de cadena ligera endógeno

Para optimizar el uso de los segmentos génicos λ humanos en un locus de cadena ligera de ratón endógeno, se cruzaron ratones que albergaban los segmentos génicos λ humanos no reordenados con otro ratón que contenía una delección en el locus de cadena ligera endógeno opuesto (κ o λ). Por ejemplo, los segmentos génicos λ humanos posicionados en el locus κ endógeno serían los únicos segmentos génicos de cadena ligera funcionales presentes en un ratón que también portaría una delección en el locus de cadena ligera λ endógeno. De este modo, la descendencia obtenida expresaría solamente cadenas ligeras λ humanas como se describe en los ejemplos anteriores. El cruce se realiza por técnicas convencionales reconocidas en la técnica y, como alternativa, por compañías comerciales, por ejemplo, The Jackson Laboratory. Se exploran cepas de ratón que albergan segmentos génicos de cadena ligera humana en el locus κ endógeno y una delección del locus de cadena ligera λ endógeno para la presencia de las cadenas ligeras λ quiméricas inversas únicas (ser humano-ratón) y la ausencia de cadenas ligeras λ de ratón endógenas.

También se cruzaron ratones que albergaban un locus de cadena ligera λ humano no reordenado con ratones que contenían un remplazo del locus del gen variable de cadena pesada de ratón endógeno con el locus del gen variable de cadena pesada humano (véase, el documento US 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals, el ratón modificado por ingeniería genética VELOCIMMUNE®). El ratón VELOCIMMUNE® incluye, en parte, un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada humana unidas de forma funcional a loci de región constante de ratón endógeno de modo que el ratón produce anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada humana y una región constante de cadena pesada de ratón en respuesta a estimulación antigénica. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas de los anticuerpos puede aislarse y unirse de forma funcional a ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada humana. El ADN después puede expresarse en una célula capaz de expresar la cadena pesada completamente humana del anticuerpo. Tras un programa de cruce adecuado, se obtienen ratones que albergan un remplazo del locus de cadena pesada de ratón endógeno con el locus de cadena pesada humana y un locus de cadena ligera λ humana no reordenada en el locus de cadena ligera κ endógena. Pueden aislarse anticuerpos que contienen regiones variables de cadena pesada humana mutadas somáticamente y regiones variables de cadena ligera λ humana tras inmunización con un antígeno de interés.

Ejemplo VII

Generación de anticuerpos a partir de ratones que expresan cadenas pesadas humanas y cadenas ligeras λ humanas

5 Después de cruzar ratones que contienen el locus de cadena ligera λ humana no reordenado con diversas cepas deseables que contienen modificaciones y deleciones de otros loci de Ig endógenos (como se ha descrito anteriormente), se inmunizan los ratones seleccionados con un antígeno de interés.

10 Generalmente, se expone un ratón VELOCIMMUNE® que contiene una de las regiones de cadena ligera de línea germinal humana reordenadas individuales con un antígeno, y se recuperan células linfáticas (tales como células B) del suero de los animales. Las células linfáticas pueden fusionarse con una línea celular de mieloma para preparar líneas células de hibridoma inmortales, y dichas líneas células de hibridoma se exploran y seleccionan para identificar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos que contienen cadena pesada humana y cadena
 15 ligera λ humana que son específicas para el antígeno usado para la inmunización. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras λ puede aislarse y unirse a regiones constantes isotópicas deseables de la cadena pesada y la cadena ligera. Debido a la presencia de los segmentos génicas hV λ adicionales en comparación con el locus λ de ratón endógeno, la diversidad del repertorio de cadena ligera se aumenta drásticamente y confiere mayor diversidad al repertorio específico de antígeno tras inmunización. Las secuencias de anticuerpo clonadas resultantes pueden producirse posteriormente en una célula, tal como una célula CHO. Como alternativa, el ADN que codifica los anticuerpos quiméricos específicos de antígeno o los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas puede aislarse directamente a partir de linfocitos específicos de antígeno (por ejemplo, células B).

25 Inicialmente, se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos se caracterizan y seleccionan para características deseables, incluyendo afinidad, selectividad, epítipo, etc. Las regiones constantes de ratón se reemplazan con una región constante humana deseada para generar el anticuerpo completamente humano que contiene una cadena pesada humana mutada somáticamente y una cadena ligera λ humana derivada de un locus
 30 de cadena ligera λ humano no reordenado de la invención. Las regiones constantes humanas adecuadas incluyen, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 de tipo silvestre o modificada.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Macdonald, Lynn Stevens, Sean Gurer, Cagan Murphy, Andrew J. Hosiawa, Karolina A.

<120> RATONES CON CADENA LIGERA LAMBDA HUMANA

<130> 796A-WO

40 <140> A asignar
<141>

45 <150> 61/357.314
<151> 22-06-2010

<150> 61/357.317
<151> 22-06-2010

50 <160> 105

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

55 <210> 1
<211> 219
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220>
<223> sintética

<400> 1

ES 2 576 928 T3

```

actttcagaa tgttcttgaa cagtctctga gaaacacgga agacggccgc ataatctcgt 60
atagtataca ttatacgaag ttattctaga cccccgggct cgataactat aacggtccta 120
aggtagcgac togagataac ttcgtataat gtatgctata cgaagttatc catggtaagc 180
ttacgtggca tacagtgtca gattttctgt ttatcaagc 219

```

5 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética

<400> 2
 agctgaatgg aaacaaggca a 21

15 <210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintética

<400> 3
 ggagacaatg cccagtg a 19

25 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintética

35 <400> 4
 tcccataggg ctaggattc c 21

40 <210> 5
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintética

<400> 5
 tcccctcaca ctgtcccc 19

50 <210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

55 <400> 6
 ggtggagagg ctattcggc 19

60 <210> 7
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

5 <400> 7
 gaacacggcg gcatcag 17

10 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> sintética

15 <400> 8
 tcaaccttc ccagcctgc t 21

20 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintética

25 <400> 9
 cccagagag agaaaacaga tttt 24

30 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> sintética

35 <400> 10
 ccctggtgaa gcatgttgc 20

40 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintética

50 <400> 11
 tgtggcctgt ctgccttacg 20

55 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

60 <220>
 <223> sintética

60 <400> 12
 cacacctaga ccccggaagt c 21

65 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

5 <400> 13
 tcgctttgcc agttgattct c 21

10 <210> 14
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> sintética

15 <400> 14
 tgcggccgat cttagcc 17

20 <210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintética

25 <400> 15
 ttgaccgatt ccttgccg 18

30 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> sintética

35 <400> 16
 gcaaacaaaa accactggcc 20

40 <210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintética

50 <400> 17
 ggccacattc catgggtc 19,

55 <210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

55 <220>
 <223> sintética

60 <400> 18
 ccatgactgg gcctctgtag ac 22

65 <210> 19
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

5 <400> 19
 caagtcaggg tgctaagct gtatc 25

10 <210> 20
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> sintética

15 <400> 20
 cacagctgt gcagcctcc 19

20 <210> 21
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintética

25 <400> 21
 gggcactgga tacgatgat gg 22

30 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> sintética

35 <400> 22
 tcataggtag gtctcagttt g 21

40 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintética

50 <400> 23
 tgatctgcgc tgttcatcc t 21

55 <210> 24
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

55 <220>
 <223> sintética

60 <400> 24
 tgacatgaac catctgttc tctctgaca a 31

65 <210> 25
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

5 <400> 25
 agagacgctc cgaggtaag gtgctctag 29

10 <210> 26
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> sintética

15 <400> 26
 tgggcacaac agacaatcgg ctg 23

20 <210> 27
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintética

25 <400> 27
 accctctgct gtcct 16

30 <210> 28
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> sintética

35 <400> 28
 ccaagcagga ggtgctcagt tcccaa 26

40 <210> 29
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintética

50 <400> 29
 tccacactgt cggctgggag ctca 24

55 <210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

60 <220>
 <223> sintética

60 <400> 30
 acgagcgggt tcggccatt c 21

65 <210> 31
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

5 <400> 31
 ctgttcctct aaaactggac tccacagtaa atggaaa 37

<210> 32
 <211> 27
 <212> ADN
 10 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

15 <400> 32
 tgccgcttat acaactctgc catctgc 27

<210> 33
 <211> 37
 20 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

25 <400> 33
 agaagaagcc tgtactacag catccgtttt acagtca 37

<210> 34
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

35 <400> 34
 gggctacttg aggacctgc t 21

40 <210> 35
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintética

<400> 35
 50 gacagccctt acagagtttg gaa 23

<210> 36
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

55 <220>
 <223> sintética

<400> 36
 60 aagaccagga gctctgccta agt 23

<210> 37
 <211> 22
 <212> ADN
 65 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

5 <400> 37
 cccatcacga actgaagtg ag 22

10 <210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> sintética

20 <400> 38
 cagggcctcc atcccaggca 20

25 <210> 39
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintética

35 <400> 39
 cccagtggtg tgaatcactc taccctcc 28

40 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintética

50 <400> 40
 cctctctcc tcaccctcct 20

55 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

60 <220>
 <221> variación
 <222> (4)...(4)
 <223> r = a o g

65 <220>
 <221> variación
 <222> (9)...(9)
 <223> s = c o g

70 <220>
 <221> variación
 <222> 11, 12, 13
 <223> y = c o t

75 <400> 41
 atgrccdgtg yyctctcct 20

80 <210> 42
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

5 <400> 42
 ctctcactc agggcaca 18

10 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <221> variación
 <222> (18)...(18)
 <223> s = c o g

20 <400> 43
 atggcctggg ctctgtsct 20

25 <210> 44
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <221> variación
 <222> (11)...(11)
 <223> y = c o t

35 <220>
 <221> variación
 <222> (13)...(13)
 <223> s = c o g

40 <400> 44
 atggcctgga ycsctctcc 19

45 <210> 45
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

50 <220>
 <221> variación
 <222> 11, 16, 18, 21
 <223> y = c o t

55 <220>
 <221> variación
 <222> (15)...(15)
 <223> r = a o g

60 <220>
 <221> variación
 <222> (20)...(20)
 <223> m = a o c

65 <400> 45
 tcacatggc ytggrycycm ytc 23

<210> 46
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>

<223> sintética
 <400> 46
 tcaccatggc ctgggtctcc tt 22
 5
 <210> 47
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 10
 <220>
 <221> variación
 <222> (16)...(16)
 <223> m = a o c
 15
 <220>
 <221> variación
 <222> (19)...(19)
 <223> y = c o t
 20
 <400> 47
 tcaccatggc ctggamtcyt ct 22
 25
 <210> 48
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> sintética
 <400> 48
 tcaccatggc ctgggctcca ctact 26
 35
 <210> 49
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> sintética
 <400> 49
 tcaccatggc ctggactcct 20
 45
 <210> 50
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> sintética
 <400> 50
 tcaccatggc ctggatgatg ctt 23
 55
 <210> 51
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> sintética
 <400> 51
 taaatatggc ctgggctcct ct 22
 65

5 <210> 52
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética

 10 <400> 52
 tcaccatgcc ctgggctctg ct 22

 15 <210> 53
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética

 20 <400> 53
 tcaccatggc cctgactcct ct 22

 25 <210> 54
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética

 30 <400> 54
 cccaagctta ctggatggtg ggaagatgga 30

 35 <210> 55
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética

 40 <400> 55
 gtaaaacgac ggccag 16

 45 <210> 56
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 50 <220>
 <223> sintética

 55 <400> 56
 caggaaacag ctatgac 17

 60 <210> 57
 <211> 440
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética

 65 <400> 57

ES 2 576 928 T3

```

gggcctgggc tctgctgctc ctcaccctcc tcaactcaggg cacaggggtcc tgggcccag 60
ctgccctgac tcagcctccc tccgcgtccg ggtctcctgg acagtcagtc accatctcct 120
gcactggaac cagcagtgac gttggtggtt ataactatgt ctctctggtac caacagcacc 180
caggcaaagc ccccaaaactc atgatttatg aggtcagtaa gcggccctca ggggtccctg 240
atcgcttctc tggtccaag tctggcaaca cggcctccct gaccgtctct gggctccagg 300
ctgaggatga ggctgattat tactgcagct catatgcagg cagcaacaat ttctgtcttcg 360
gaactgggac caaggtcacc gtcctagggg ctgatgctgc accaactgta tccatcttcc 420
caccatccag taagcttggg                                     440

```

5 <210> 58
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética
 <400> 58

```

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc tcaactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc ggtctcctg gacagtcagt caccatctcc 120
tgcactggaa ccagcagtgac cgttggtggt tataactatg tctctggtta ccaacagcac 180
ccaggcaaag ccccaaaact catgatttat gaggtcacta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggtccag 300
gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtaagcttgg g                                     441

```

15 <210> 59
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintética
 <400> 59

```

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc tcaactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60

```

```

tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc ggtctcctg gacagtcagt caccatctcc 120
tgcactggaa ccagcagtgac cgttggtggt tataactatg tctctggtta ccaacagcac 180
ccaggcaaag ccccaaaact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggtccag 300
gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtaagcttgg g                                     441

```

25 <210> 60
 <211> 438
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintética
 <400> 60

ES 2 576 928 T3

```

atggcctggg ctctgctcct caccctcctc actcagggca cagggctcctg ggcccagctc 60
gccctgaetc agcctccctc cgggtccggg tctcctggac agtcagtcac catctcctgc 120
actggaacca gcagtgcagt tgggtggttat aactatgtct cctgggtacca acagcaccca 180
ggcaaagccc ccaaactcat gatttatgag gtcagtaage ggccctcagg ggccctgat 240
cgcttctctg gctccaagtc tggcaacacg gctccctga ccgtctctgg gctccaggct 300
gaggatgagg ctgattatta ctgcagctca tatgcaggca gcaacaatta tgtcttcgga 360
actgggacca aggtcacctg cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420
ccatccagta agcttggg                                     438

```

5 <210> 61
 <211> 438
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética

<400> 61

```

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc gggctcctg gacagtcagt caccatctcc 120
tgcactggaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaag cccccaaact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggtcgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa tgtcttcgga 360
actgggacca aggtcacctg cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420
ccatccagta agcttggg                                     438

```

15 <210> 62
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintética

<400> 62

```

atggcctggg ctctgctcct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc gggctcctg gacagtcagt caccatctcc 120
tgcactggaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaag cccccaaact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggtcgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtaagcttgg g                                     441

```

25 <210> 63
 <211> 442
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintética

35 <400> 63

ES 2 576 928 T3

```

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc gggctcctg gacagtcagt caccatctcc 120
tgcactggaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaag ccccaaaact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggctctcc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa tttatgtctt 360
cggaactggg accaaggcca cctccttagg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt 420
cccacatcc agtaagcttg gg 442

```

5 <210> 64
 <211> 428
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética

<400> 64

```

ccttcatttt ctccacaggt ctctgtgctc tgccctgtgct gactcagccc ccgtctgcat 60
ctgccttgct gggagcctcg atcaagctca cctgcaccct aagcagtgag cacagcacct 120
acaccatcga atgggatcaa cagagaccag ggaggtcccc ccagtatata atgaaggtta 180
agagtgatgg cagccacagc aagggggagc ggatccccga tcgcttcatg ggctccagtt 240
ctggggctga ccgctacctc accttctcca acctccagtc tgacgatgag gctgagtatc 300
actgtggaga gagccacacg attgatggcc aagtcgggtg tgtcttcgga actgggacca 360
aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca ccatccagta 420
agcttggg 448

```

15 <210> 65
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintética

<400> 65

```

atgacctgct cccctctcct cctcaccctt ctattcact gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgtgttga cgcagccgcc ctcagtgtct ggggcccag gacagaaggc caccatctcc 120
tgctctggaa gcagctccaa cattgggaat aattatgtat cctggtacca gcagctccca 180
ggaacagccc ccaaactcct catttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240
cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcaccgg actccagact 300
ggggacgagg ccgattatta ctgcggaaca tgggatagca gcctgagtgc ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggteac cgtccttagg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtgagcagtt a 441

```

25 <210> 66
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintética

35 <400> 66

ES 2 576 928 T3

```

atgacctgct cccctctcct cctcaccctt ctcattcact gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgtgttga cgcagccgcc ctcagtgtct gcgccccag gacagaaggt caccatctcc 120
tgctctggaa gcagctccaa cattgggaat aattatgat cctggtagca gcagctccca 180
ggaacagccc ccaaactcct catttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240
cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcaccgg actccagact 300
ggggacgagg ccgattatta ctgcggaaca tgggatagca gcctgagtgc ggcttttttt 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtgagcagtt a 441

```

5 <210> 67
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética

<400> 67

```

cccgggcaga gggtcaccat ctcttgttct ggaagcagct ccaacatcgg aagtaatact 60
gtaaactggt accagcagct cccaggaacg gcccccaaac tcctcatcta tagtaataat 120
cagcggccct caggggtccc tgaccgattc tctggctcca agtctggcac ctcagcctcc 180
ctggccatca gtgggtccca gtctgaggat gaggctgatt attactgtgc agcatgggat 240
gacagcctga atggttatgt cttcggaaact gggaccaagg tcaccgtcct aggggctgat 300
gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca tccagtgagc agtta 345

```

15 <210> 68
 <211> 432
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintética

<400> 68

```

atggcctgga cccctctcct gctccccctc ctcactttct gcacagtctc tgaggcctcc 60
tatgagctga cacagccacc ctcgggtgtca gtgtccccag gacaaacggc caggatcacc 120
tgctctggag atgcattgcc aaaaaaatat gcttattggt accagcagaa gtcaggccag 180
gccctgtgc tggatcatca tgaggacagc aaacgaccct ccgggatccc tgagagattc 240
tctggctcca gctcagggac aatggccacc ttgactatca gtggggccca ggtggaggat 300
gaagctgact actactgtta ctcaacagac tacagtggta atcatgtctt cggaaactggg 360
accaaggcca cgtcctaggg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt cccaccatcc 420
agtgagcagt ta 432

```

25 <210> 69
 <211> 426
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintética

35 <400> 69

ES 2 576 928 T3

atggcctgga ctctctctt tctgttctc ctcaacttget gccaggggc caattcccag 60
 gctgtgggta ctcaaggagc ctcaactgact gtgtccccag gagggacagt cactctcacc 120
 tgtggctcca gcaactggagc tgtcaccagt ggtcattatc cctactgggt ccagcagaag 180
 cctggccaag cccccaggac actgatttat gatacaagca acaaacactc ctggacacct 240
 gcccggttct caggctccct ccttgggggc aaagctgcc tgacctttc ggggtgcgag 300
 cctgaggatg aggctgagta ttactgcttg ctctcctata gtggtgctta tgtcttcgga 360

actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420
 ccatcc 426

5 <210> 70
 <211> 331
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética

<400> 70

agtggctctg ggacagacgg ccaggattac ctgtggggga aacaacattg gaagtaaaaa 60
 tgtgcaactg taccagcaga agccaggcca ggccccctgt ctggtcatct atagggataa 120
 caaccggccc tctgggatcc ctgagcgatt ctctggctcc aactcgggga acacggccac 180
 cctgaccatc agcagagccc aagccgggga tgaggctgac tattactgtc aggtgtggga 240
 cagcagcact tatgtcttcg gaactgggac caaggtcacc gtcttagggg ctgatgctgc 300
 accaactgta tccatcttcc caccatccag t 331

15 <210> 71
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintética

<400> 71

actcctctcc tcctcctggt cctctctcac tgcacagggt ccctctcgca ggctgtgctg 60
 actcagccgt cttccctctc tgcactctct ggagcatcag ccagtctcac ctgcaccttg 120
 cgcagtggca tcaatggttg tacctacagg atatactggt accagcagaa gccagggagt 180
 cctccccagt atctcctgag gtacaaatca gactcagata agcagcaggg ctctggagtc 240
 cccagccgct tctctggatc caaagatgct tcggccaatg cagggatttt actcatctct 300
 gggctccagt ctgaggatga ggctgactat tactgtatga tttggcacag cagcgcttat 360
 gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc ctaggggctg atgctgcacc aactgta 417

25 <210> 72
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintética

35 <400> 72

ES 2 576 928 T3

```

tttctgttcc tcctcacttg ctgcccaggg tccaattctc agactgtggt gactcaggag 60
ccctcactga ctgtgtcccc aggagggaca gtcactctca cctgtgcttc cagcactgga 120
gcagtcacca gtggttacta tccaaactgg ttccagcaga aacctggaca agcaccagg 180
gcactgattt atagtacaag caacaaacgc tcctggacc ctgcccgggt ctcaggctcc 240
ctccttgggg gcaaagctgc cctgacactg tcaggtgtgc agcctgagga cgaggctgag 300
tattactgcc tgctctacta tgggtggtgt tatgtcttcg gaactgggac caaggtcacc 360
gtcctagggg ctgatgctgc accaactgta tcc 393

```

5 <210> 73
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética
 <400> 73

```

atggcctggg ctctgctgct cctcactctc ctcactcagg acacagggtc ctgggccag 60
tctgcctga ctcagcctgc ctccgtgctt ggggtctctg gacagtogat caccatctcc 120
tgactggaa ccagcagtga tgttgggagt tataaccttg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaag cccccaaact catgatttat gagggcagta agcggccctc aggggtttct 240
aatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgacaatctc tgggtccag 300
gctgaggacg aggctgatta ttactgctgc tcatatgcag gtagtagcac ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatc 417

```

15 <210> 74
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintética
 <400> 74

```

cagtctgccc tgactcagcc tgcctcogtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggg ggttataact atgtctcctg gtaccaacag 120
caccaggca aagcccccaa actcatgatt tatgaggta gtaatcggcc ctcaggggtt 180
tctaactcgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct cctgaccat ctctgggctc 240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcag cacttatgtc 300
ttcggaactg ggaccaaggt caccggcctg ggggctgatg ctgcacca 348

```

25 <210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintética
 <400> 75
 aacaaccgag ctccagggtg 20

35 <210> 76
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> sintética

<400> 76
 agggcagcct tgtctcaa 19

 5 <210> 77
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> sintética

 <400> 77
 cctgccagat ttcaggctc 20

 15 <210> 78
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> sintética

 <400> 78
 catcacaggg gcacagactg 20

 25 <210> 79
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> sintética

 <400> 79
 gatttgctga gggcagggt 19

 35 <210> 80
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> sintética

 <400> 80
 cccaagtct gatccttct t 21

 45 <210> 81
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> sintética

 <400> 81
 gctgaccaac gatcgctaa 20

 55 <210> 82
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> sintética

 65 <220>
 <223> sintética

ES 2 576 928 T3

<400> 82
 taagcgccac actgcacct 19

5 <210> 83
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética

<400> 83
 cctgccagat tctcaggctc cctg 24

15 <210> 84
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintética

<400> 84
 ctgattggag acaaggctgc cct 23

25 <210> 85
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintética

<400> 85
 ccttcatact ctgcatcct ccttctcca 30

35 <210> 86
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> sintética

45 <400> 86
 ttccttctct tctgtgactc aattattgt ggaca 35

50 <210> 87
 <211> 159
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> sintética

<400> 87

 tctggcaacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
 tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttctgtgt tcggaggagg caccggctg 120
 accgccctcg gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

60 <210> 88
 <211> 159
 <212> ADN

ES 2 576 928 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 5
 <400> 88
 tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
 tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttatgtct tcggaactgg gaccaaggctc 120
 accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
 10
 <210> 89
 <211> 159
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> sintética
 <400> 89
 tctggcacct cagcctccct ggccatcagt gggctccagt ctgaggatga ggctgattat 60
 tactgtgcag catgggatga cagcctgaat ggtgctgtgt tcggaggagg caccagctg 120
 accgccctcg gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
 20
 <210> 90
 <211> 159
 <212> ADN
 25
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 30
 <400> 90
 tctggcacct cagcctccct ggccatcagt gggctccggt ccgaggatga ggctgattat 60
 tactgtgcag catgggatga cagcctgagt ggtcgggtgt tcggcggagg gaccaagctg 120
 accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
 35
 <210> 91
 <211> 153
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 40
 <400> 91
 tcggggaaca cggccaccct gaccatcagc agagcccaag ccggggatga ggctgactat 60
 tactgtcagg tgtgggacag cagcactgct gtgttcggag gaggcacca gctgaccgcc 120
 ctcggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153
 45
 <210> 92
 <211> 156
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> sintética

ES 2 576 928 T3

<400> 92

```
tcagggacaa tggccacctt gactatcagt ggggccagg tggaggatga agctgactac 60
tactgttact caacagacag cagtggtaat gctgtgttcg gaggaggcac ccagctgacc 120
gccctcgggg ctgatgctgc accaactgta tccatc 156
```

5 <210> 93
 <211> 159
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética

<400> 93

```
tcagggacaa tggccacctt gactatcagt ggggccagg tggaggatga agctgactac 60
tactgttact caacagacag cagtggtaat cataggggtg tcggcggagg gaccaagctg 120
accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
```

15 <210> 94
 <211> 159
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

25 <400> 94

```
tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttatgtct tcggaactgg gaccaaggtc 120
accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
```

30 <210> 95
 <211> 159
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> sintética

<400> 95

```
gatgcttcgg ccaatgcagg gattttactc atctctgggc tccagtctga ggatgaggct 60
gactattact gtatgatttg gcacagcagc gctgtggtat tcggcggagg gaccaagctg 120
accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
```

40 <210> 96
 <211> 153
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintética

<400> 96

50

ES 2 576 928 T3

cttgggggca aagctgccct gacactgtca ggtgtgcagc ctgaggacga ggctgagtat 60
 tactgcctgc tctactatgg tgggtgctcg gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc 120
 ctaggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153

5 <210> 97
 <211> 153
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética

<400> 97

cttgggggca aagctgccct gaccctttcg ggtgogcagc ctgaggatga ggctgagtat 60
 tactgcttgc tctcctatag tgggtgctoga gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc 120
 ctaggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153

15 <210> 98
 <211> 165
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintética

<400> 98

tcaggcctga atcggtacct gaccatcaag aacatccagg aagaggatga gagtgactac 60
 cactgtgggg cagaccatgg cagtgggagc aacttcgtgt ctgtgttcgg aggaggcacc 120
 cagctgaccg ccctcggggc tgatgctgca ccaactgtat ccac 165

25 <210> 99
 <211> 164
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintética

35 <400> 99

tctggcacgt cagccaccct gggcatcacc ggactccaga ctggggacga ggccgattat 60
 tactgoggaa catgggatag cagcctgagt gctggccccg ggtgttcggc ggagggacca 120
 agctgaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catc 164

40 <210> 100
 <211> 22800
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintética

<400> 100

ES 2 576 928 T3

aagctctaaa actacaaact gctgaaagat ctaatgacta ggacagccta gtaattttca 60
taggggcata aatgtgaaac gccttgtgca tcgtagaaga aagcagaaga gaaagcattc 120
ccaatttctt aactgccttt tacctatatt aatcagtaat atactggctt ttacctctgt 180
taatcataat aaacaaattc tcaataaatt ttatcgatac tcttcaatgc ctgctcagca 240
acattttccg aaggcagctc aagatattaa ataactcata agggccaacc tctatttgca 300
gcattctttg ggatttaacc agtttcccaa gactcttttc acaatgttaa gatgttagaa 360
atagatccaa aactaggtga tatatcccct agtaaaactg tgaggtcaaa cttgtctggc 420
taatgcttcc atttaaaaat ttctctttct tgatccttca ttgtatgtac acaataaatc 480
aggggaaaac tttaactgag tgaatcaaag tattctcatt attataatag gagcttcaca 540
cacacacaaa aaaatcaatt ctattactct cagcctcagt tcctaaagcc aagttaaagt 600
cctgttctaa gatcattggt gcatgaccat atgtattcca ggtctaactc aaactgtgga 660
taaatacccag caggacatta gagatttttg tgagagtaag catataggat tcagggttta 720
tgagctttag atttttcttg tcaaaatgaa tgagagttgc catatctaaa aattattccc 780
agataaataa aattcactac ctagaattaa tttatgcata taagtagaaa tgctatctcc 840
ctttttacca tccaaagtgg aaagcctcat ggaactagaa attaataata gaaaaatcag 900
ttaataaaaag tatgtcattt catcaattca ataagttata atagcaaaaa accataataa 960
attatcactt aaatgtcaat acatttataa actatggtag ataaatagga tattgaatag 1020
ccattgatgc tcctgatgaa aattagcagg cagtgataaa tgataaatat gaagcacatg 1080
tcaataaata aaataagttt tatgtaattt aggagaaaat ggtgataatg acacaaaatg 1140
tgaattatgg atgcatctat aaaattcttt gtacatttgt gaattgtaaa tatttatctt 1200
agagacatta ttactttgta tatgttccat ttgctcacct atatgtccca gtctccttac 1260
aaatgctatg gccaaagaaa taggcataca tacatccttt gcaggctgag gcaggaaaaa 1320
gatcttacgg aattttccag tctatccttt atctgtataa gcaacttaag aggccatgtg 1380
ctccaaatgg tgcaaataca agatggtaga gcctctgtct gcctggatcc ttgagtggct 1440
gcatggagca gagcaccttt ctggccctgg tgaagattgt agcatgagca agatataagc 1500
atgtgttggg gctaggccat gagatttggg gcagtgggat aacctaccct attatggaaa 1560
atataaatac acaaaacaga aaagagagag agaagtgaga gaagactgtg agagaagtgc 1620
atgagagaag actgtgtttt gttcatttcc tataatccta tatcaccatg ggatcctgtg 1680
ccttctggtg atcaaaactaa tgttctacag ctccaaagaa gaatgctcgc ctaacgtctc 1740
cattccaatg acctagagac taaaagccaa aaagaacctt agaaattatc tattgcattc 1800
tttgatgtaa ggaaatatct tagagggcac agatagaaat atcttaaccc aggtcactta 1860

ES 2 576 928 T3

gttcgtggca gagctgaggg taaaaccagg ccttttgact cctaattttg tgctctttac 1920
accttctcac atcacttctc caacccaaag tctagcagaa aaggctaaaa taagatatat 1980
gcatagattt gctattataa gtccatgtac ttctcagac gctttaagat ggggcttctc 2040
atggttcaca ataagcagca gagggaagtg aataactatc ttcgtctccc ctactgctat 2100
ttgtgcagtt tgaagcttat ctcttaaatc atgttttctt ctogtagtaa ataclacaac 2160
ttgtgccttt tatgtgtgta taaattttaa tataattttt ttccatgaac cattcaagta 2220
aaatggacac tccaaaaaga tgttcaataa ggttacatgg cttcacattg cccctctac 2280
accatcttgt ggagctacac attcacctca cccaaatttg agaaaaataa tcaagaaaat 2340
gactctcact agcagtgaga ccaagtccat aagcactaat gtcactcagtg cacactgcag 2400
cctcatgctg ccaagcatgt tttgggcgta tccttgact ggtttgggta catgatcaaa 2460
ggtacatttt ccacctgcat agccccatcc tggatctata gccttcttg tgtctttgtg 2520
aacaacctag tgtgaactca aagtatgaga cagatctcaa ttaatttaga aagtttattt 2580
tcccaagatt aaggacaagc ccatgataaa gcctccagag gtcctgatat atgtgccaa 2640
gggggtcggg gcacagcttg gtgttataca ttttagggag acaagaaaca tcaatcgata 2700
tgtagaagat gtgcacgcgt ttggctgga aaggtgtgac aactcaaggc agggaagggg 2760
gcttctctct ggggttgcct tgttttgagt ccttcacatg cctttcacat gcagaaggaag 2820
ggtagagaaa tagtcattta tgccttagtc tggcttattg aaacagtagg gcagaaggaag 2880
cattgcatat gcatttgtct gaagtgaaca gagggatgac tttgagctct gtcctttctt 2940
tgtccacaag gaattacctt gtgggcaaat tgtgagggag gtatgtagct ttttttctt 3000
tgtagctatc ttatttagga ataaaatggg aggcaggttt gcctgatgca attcccagct 3060
tgactttccc ttttggctta gtgatttttg gggctctgag gtttattttt tctttcacat 3120
tagtataact acttttcttt ttctaattcc ttttctactt gtatgtgta cagctgactt 3180
atgttacttg caaaaagaat tctgactaat gcaccatctg actagaaggc agggttcttc 3240
gatgataacg aatcctccag aatctagtaa acagaattgc ctgaaaaaga ggtgggtgtc 3300
ttcttggggg atttctcatg gcaatgaatg gcaactggcc aaaggattta tgaccagact 3360
gagctctctt ttatctatce tgttactcac caagacctat tagggtttgt gctccacagg 3420
gacactgggt tctaagttct agggttaaac agtccactcc caggcccacc acaccatacc 3480
ctcctgacat ctgggtgaaca gcaataaaat tgtttcttat tctgaaaatc ctccaatact 3540
tccaccatcc ccaaaaatgc agtggaggag gagagaaaat gaattgttcc attagagaac 3600
acaatatcca ttatattatt ctggccttt gagatacctt acaaaaacaa tacaacaaaa 3660
gtcccaattt aacatctttt aataatcttt acaaaacaga acacatctcc tttcttgata 3720
atagtcaaga ggctcagtg gcaactgtgg gaaaagtgtc agattctggg catgtttcaa 3780
aggtagaaaa aatagaattt gttaacatat tggatgtgag gcgtgggaga aacgtgaaat 3840
caaggtgggt gcaagtgttt aacctgagca actagagaat ttggaaggac attttctgag 3900
atggggagaa caggcgggaa tcagggatta gagttgaaca tattagacat ttgagatgcc 3960
tgctagacct ctaattggca atatcccttg gacaggtgga tgaatatgcg tgattctgga 4020
gttcgggaaa tagtccgggt ggagatgcaa atttgggaaa cagggcgagg ttactagcaa 4080
tgagttaaat caatgaaggc aggcctgggac ctggcaggtg acccaacaag tagaggtcga 4140
agagatgaga agaaaacagc acaggagact tagaagcagt ggtcaggagg aaggagttga 4200
accaagaaag tgatgtccca gagccaacaa aataaggatt tctttctgt ttacaaatgt 4260
aaaattaaaa ggtttaataa aaagaaaatt tactttatg gttggttgtt attaagtggg 4320
ccaaacactg tctcctattt gtagaatcag aactctctca tggcagtaga aaatttgga 4380
agttactttt taaaagggtg gtgcactgct gccctttgct ggtcaagttt atgcactgca 4440
aattccaagg acgattgctc gtcagctttt ctcttttaa atagctcagg ctgtacaagc 4500
tagaagaac acgcgaagat attccttcca acatttgcat ttgacttatg ggaagtgcag 4560
gttcagccag aaaagttgtg tgcaaggccg tttatgtaag tttatcagac ctgattctta 4620
cggctcttcc cattgtttcg agcctccctt ccattcactt cccgctcata cgcgaccaag 4680
tataggacag gagtagttat tctgcacttt atagcagctc cactgtctgg cactctgatg 4740
ttctttaatt acaagcttta tgacagtgat tctcaacctg ctccactgcc tccacctagt 4800
ggcagaaaga agaaaatgtg tgtaactcgg gagtctctgg tctgaaagct cgggggtatc 4860
atttcttcaa agtcttgagc ttgttttbtg ttgtatttat ttatttattt gttttagaga 4920
caaggtctcg cactgcactc cagcctggga gacagagcga gacaattcag gatctatcta 4980
gtgaataaag agatatacagt aatgactgtt ttatattgtg gctgtagcgc attcgagggg 5040
taattcgatt ctgttctgct ttcgaaatgca tggctcactg taacctcaa ctcccgggct 5100
caagcgatcc tctacctca gcttctccag tagttgagct tgatttattt taaagtttca 5160
taaaattttg gcatttctt ccacaatatg gccatgtgtg ctttactata aaatattttc 5220
atcacaaaat ttacatcgct ggaaatcccc ataagccagt ttgagaaaca caaccacaaga 5280
aagcagaaca gactcaaatt atcccttaa tcccccttaa ccacaaatat aaaacagctc 5340
gtgactgggc gtgttggctt acacctgtaa tcccagcact ttgggaggcc aaggcgggtg 5400
gattacttga gctcaggagt tcaagaccag cctggccaac atggtgaaac cccgtcccta 5460
ttaaaaatac aaaattattc aggagttgtg gcaggcagtt gtaatcccag ctacttggga 5520

ggctgaggca ggagaatcac ttgaaccag gaggtggagg ttgtagtgag ccaagattgt 5580
 gccagtgcac tccagcctgg gcaacagagc gagacttcca tcttaaaaaa aaaaaattaa 5640
 gtaaataaaa tataaaaaaa taaagcagtc cctattgata tctctttatt cactaaatca 5700
 acctggaatt gacctgaatt ctgatttttt tttcatcatg gattttttgc attaattttg 5760
 attgtttaaa tattgcatta aatatttttt tatcttgact actgagtttg cgggacctcc 5820
 ttaaaattta tgaccaaggc aatgcctcac tcaactcgct taccataatc tgggccacat 5880
 atcaggggct ccaatagcaa gcaacatgac ttttgaacag ctaagacttc tctcttcact 5940
 gtgaagacca gatgggacct gcaaacagtg taacctctac atgaaaatgc acgagattcc 6000
 aactacaacc aggcacaaaa gactctgatg gtgaagtccc agccctccaa gtcccaactt 6060
 cctgaaggga aagagcacc ccaagtctga ccagaggcca gaggcataac gaagatggaa 6120
 tgtgagcttg acatagaagg ggtggtagca cctggctcag taatgaagag gctttcggtc 6180
 ctgaagggaag agctcagcac attcaaagat tagaaggagg gtcccagtca taggagcagg 6240
 gaaggagaga aggcccaata agaaacacag acaggaggga ggggtcaggg caagatcata 6300
 ctggaacaaa ctgagagact aataaaagtc acagtgccca gtccccacat ggaccagact 6360
 cttcgggaatc tctaggcatc aatttgggca ccagtagttt tcaaagttct ccagaagatt 6420
 ctatgcacac cagccaaggg tgggaaccac aggtgttggc ctagggatca tgacaatgag 6480
 tttctaagtg caataagaaa cctccagaga gtttaagcag gggaaataatt tgatttgttt 6540
 cttgtttgtg atttttaaag atcagctctgg ttactgtgtg taagacaata atccagaaa 6600
 tctgttgctc atgaaccaca tatctgtaa tttgctccc ctgtaactgg atctaaccaa 6660
 caaaaattag tacttactaa gaaattacat gccagggac tatgctaagt aattcataaa 6720
 cactatttta tttactctc acagcaagtt tataagagaa acgttattat tccacattt 6780
 cggatgagaa atttgaggct tggggaaagt taagtaattt acctaatgtc acaccagtt 6840
 cataagatgc agagttaaga ttctaattct gtgtctaagt tgatgtcca tcaaacacac 6900
 cagcctcca actaggaagc aacatgctgg ccagaggatg ctgtcatcaa gtttacagaa 6960
 tgggttagatt tctaggcaca gatgaataaa tcaacatggt ggtttgcaat agaatgaatc 7020
 tatccagctc tgaatttgca tccaagggtt tgtgagcaca caagtctaaa agtgtggcct 7080
 cagctctgct aacttcatca aggtgaatac ctaggaggcc accctctgag accaccagat 7140
 ggacagtcca ccatctgttt acagatggta aagccacata ccagctttgc catctgatgt 7200
 tctctatttg cattcaacat ttatacaaga aatagtcata tggatccttt tcaatagaca 7260
 gtactgggga aattgaattg ccatatgcag aagaatggaa ctagacctct atctctcacc 7320
 aaatacaaaa gtttaactcaa gacagattaa agacttacct ataagacctg taactacaaa 7380
 aacactagaa gaaaacctag ggaaaatgct tctggaatta atctaggtga agaactcagg 7440
 actaagatat caaaagcaca agcaccacaaa caaaaataga caaacaggac ttaattaaac 7500
 tagaacgctt ctgaacagca agagaataaa tcaatagagt gaacagataa tctgcagaat 7560
 gggtgaaaat atttgcaaac tatgcatcct acagggaaat aatgtccaga atttagaagg 7620
 aactcaaca attcaacaac aacagcaaaa taacccccacc aaaaaagtgg gcaaggaca 7680
 tgaatagaca tttttcaaaa gaaggtatat gatatggttt ggctctgtgt ctcccaccag 7740
 atctcaacct aaattgtaat aatccccaca tatcatggga gagaccgggt gggaggtaat 7800
 tgaatcatgg gggcaggttt gtcccagctg gttctcatga tactgaataa gtcctatgag 7860
 atctgatgat tttataaagg ggagtcccc ggcacacact ctcttgctc cctccatgta 7920
 atatgtgctt ttgcttctcc ttgcttctct gccatgaltg tgaggcctct ccagccatat 7980
 ggaactgagt caattaaacc actttttctt tgtaaattac ccaatcttgg gtatgtcttt 8040
 attagcagca taagaacaga ctaatacagt gtacaaatgg ccaagaagcg taaaaaac 8100
 aaaatgctca aatcactaat cactagagaa tgcgaagtta aaaccacaat gagatattat 8160
 cttacagcag tcagaatgcc tattattaaa acaccaaaaa ataacatggt ggcaaggatg 8220
 cagagaaaag ggaatactta cacattatta gtgggaatgt aaactagtac agcttctgtg 8280
 gaaaaacta tggagatttc tcaaagaact agaaatagaa ctaccatgtg gttcagcaat 8340
 accacaactg ggtatctacc caaagggaaa taaattatta tataaaaaag atatctgcac 8400
 tcaactggtt attgcagcac tattcacaat agcaaagata tggaatcaac ccaagtgtcc 8460
 atcaacagat gattggataa agaaaactgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtat 8520
 acacatacca caatgaaata ctattcagct ataaagaaaa gaatgaaatc atgtcttttg 8580
 cagcaatgtg gttggaactg gaggcatta tcttaagtgg ataattcaaa aacagaagg 8640
 caaatgtcac atgttctcac ttataagtgg gagctaaatg atgtgtacac atggacatag 8700
 agtgtggtat gataaacact ggagattgag atgggtggaa ggggtggaagg aggttgagtg 8760
 atgagaaaat actaaatgga tacaatatac atgattcagg cgatagatac actaaaagcc 8820
 cagacttcac cactacacag tatagctatg tagcaaaatt gcacctgtat tgcttaatt 8880
 tatacaagta aaaaaagat cgtacgaatt ctgttttlla ttctctatga aattactact 8940
 gagagtatta tccaatgccg tttctatgca gtgccccaa tattatccat ttagcagctc 9000
 ctatgcaatg cccaagata gaaattgtct tcaacttlla tcccaggaaa accttcagtc 9060
 acagtagaa actagaatt tttcccctag atgaaagtta tghtaacataa cacattatct 9120
 tcatttagtc ggtttccaag aagctcagaa ccagatttla tghtcaatca aaaactgctt 9180

ES 2 576 928 T3

attttaagtg aggttactg aggtataaat tacaataaaa gccacctttt cgtgtatatt 9240
 tctataagtt ttggcaaagt catagctgtg taaccacaac cacattcaag atataggaca 9300
 agtccctcat cctttaaagt tcctttatgc cccttccttc accccagccc ttggcaacca 9360
 ctggtttttg tctgatccaa tctgttgcoo ctctctgaat gtcattgtaa tagagccatg 9420
 caatgtgaag ccttttgagt ctggctttgt tcaactgttc acttaggaga atgcatttga 9480
 gattcatctt tctgtttctg tctagcacta gttcactgtc tctgtttgag tagtattcca 9540
 ttgtgtggat atgccacaga ttgtttatct agttaacaat ttaaagccat ttggtcattt 9600
 ctaattttta gctgctaaga ataaagttgc tctaagcttt ccaatgcagg tttttgtgtg 9660
 aactcaggat ttcatttctg ttgggtaaaat tcttagcttt gggactgctg agtcatctgg 9720
 taggtgtatg ttgaacttta taagaaactg ccaaactggt tccaaagtt gctgtgctct 9780
 tttgcactec catcagcagt gaatgagggt tccacttgcct cgagcctagt attttaactt 9840
 cactatatac cttctttgat gacatatcct ttcaaatttt tggtaagtt ttatttgggg 9900
 tgttttact atggactgtg agagttcttt gttatttctg catatgatt tttctcaca 9960
 tttgtgtttt atgaatatgt tctcccaatg tctggcgcct tttattttct taactgtcca 10020
 tgtgaagagc agaagttaa ttttatgatg tccaaattat cttttttct tttcttttt 10080
 agatcaaaat aggggtctat tttgattacc actgttattt tatctccatt tgattttcga 10140
 tttttatttt ttttttcta atttcattgt aaatttttaa ttaaaccctaa atattcttag 10200
 ggaaagaggc aagataaaaa tagtctaact tgggcataaa ttttagagtc atattctctt 10260
 gccgagaaa gaaactagct ctcttacatt gattgtttaa tttcagacgt cactacttta 10320
 tgaggatgcc caaattatgg gctttaaaaa atatatatcc aaacaggggt tcagaaagaa 10380
 taactaattt gtccacaaca acacaaaaaa tgattccacc ataagtttg ccaagtgcag 10440
 ggtctatatt atttctata tatcaaatc tacaactggt tcttaaagct actgtacata 10500
 acctaaagta aatatatagg tattagttga taagacattt tatcatctat gaaatgttgc 10560
 ctgttgtcat agttagagaa tcttttaaaa tatggagcta tttcataga ttaaactatg 10620
 ccagttaaaa gttgggtaaa aagaactaca gaataatatt tatgtttatc gtgtaagggt 10680
 ttaaagcaaa ctccaagtca tttcatcaa tgaatcaat aaggttttgc aatatatat 10740
 gtatgaaaat actgatttaa aatgcaaata aggggagagt ttgagagaga gagagagacc 10800
 aatgattttt ataattctag taagtttata ggtttatggg gtttttacgt actttctac 10860
 ccaacttgtc tataagactt taatgaatca cttagaattt taaaataat ttattattac 10920
 tctgtacctg tctttactc tgcaaatctt acctgacct tttgtctaaa agcaataaaa 10980
 tctgaacctg tttatatcgt atcattgatt ttgttactta gcaagcacag tgatccatta 11040
 ggccctatga ggctcatggt ttatacaaca ctgccactcg ctgacagagt gtgacagtca 11100
 cagtcagcaa caogagacca ctttattttc attttagtg tttatagaaa ttgaaatata 11160
 cacaaatagt ataatgaacc ctaagcttca caaattaaca ttttgctaat ctgtttcaa 11220
 ctaccgctc cccctcatc caattaactc gttctctcac ctctcacac acagacactg 11280
 gcagtatttt tcagccaatc attaatcgt tgccaactga taaggacttt taaaaaaca 11340
 ccaccattcc attatgattc ccagcataat tgagagtaat tccctaatat ccaataacca 11400
 ttttctattc caatttctt gattgtctt aaactgttt taccctaagt ttgttaaat 11460
 caaagtccag gtctgttaa acatatgggt aagttttacc caaacccaa taataaata 11520
 aataaataaa taataaact attttttcca attccagggg atagtgaag agggtaaatg 11580
 ccattattta gaaacataaa tcacatcata ggactagaat tatcttgaag tcaaaattga 11640
 agactgaaa tggaaaagaa aggtatagac taaacttatt taaaactc aatgcagaac 11700
 tctaagagaa gatattagaa agttgtacca gcaactatta ttcagtttc atcagtttc 11760
 actcagctat atgtagtga aatctaacta gaggagcttg atcagataaa gagatacatt 11820
 tttctacca aggcggactc tggaggcagg tggttcagag ctgacagct gctgcaggac 11880
 ccaggtcctt tccctgctg ctctccact ctagcttctg actttcatc tgcaagatgg 11940
 gtgtttctgc caagttccag atagaagaag atagaacaca aaggagaaat aagcagtgg 12000
 gcctctgtcc atcaagcaaa atttttccag aaatgcacaa tagatttcag atgatgtctc 12060
 aacagtccta actgcaaga agctgaggaa tttagatttt ggctgggaca ctgttgccct 12120
 gtaaaaaaat tgggattctg ttattaaaga ataagaggag ggaagaaaga ttgaaaactc 12180
 ctatgcaata gtgaaaaaaa taagaaactc aataaaaaag tgggcatacc ttaaaaacag 12240
 gcaattcaca acagatgaga cccaatagc caataaacat ttttaaatgg tcaacctcat 12300
 gagtgtcag aaaaacaaa tatgtatttt aaacaaaaa taaaatacaa tgtattgacc 12360
 atttgagtgg aaaaaaatta aaaagcctga taatatcaag tattggagag atgttagagt 12420
 gaggaactc catggaggac ctatcattgc aaatgtggga atgaaactta atcacgaaat 12480
 ttgaggccaa tttgtaaatt gaaaaatgag cacacctgc aaccaagtac cccttgcaat 12540
 atttttgaaa agacaaaaac gttatgtaaa tggaatcatg caatatgtga cttttatact 12600
 cagcataatg ccctcagat ccattgaagt catgtgtatc aacagctcac ttttttttt 12660
 ttaatttttt ttagagacag agtctcactc tgtcacacag ggtggagtgc agtggcgaga 12720
 tcataactct ctctagcagc ctggaactcc tgggctcaag catctctctg cctcagcctc 12780
 ccaagtagct aggactacag gcatgggaca caacacacag ctaatttttt taaatttttt 12840

ES 2 576 928 T3

ttagagacat	ggtctcacta	tgttgccctac	gctgggtctca	aactcctag	tcaagcgatt	12900
ctcccacctc	tacttcacaa	agtgcctgtag	gtatgtaggt	atggattgta	ggtatgaacc	12960
accgtgccca	actcactact	ttttattfact	aattattcca	tgggatggat	gtaccgcagt	13020
ttgttttacc	attaatctat	tgtaggacat	tttgactgat	tccagttttt	ttttaataca	13080
aataaaacca	ctatgaatag	ttgtgtattg	tatacgtttt	tgtgctaagt	tttcattttt	13140
ctgggataag	ttttcatttc	tttgggcttt	tactgtatcc	ttgatattat	aatatgttac	13200
atcttcagtt	ttattctatt	caatatataa	tcttttattt	tccttgaaat	ctcccatgga	13260
ttgttttagaa	gtgtgttgtt	ttgtttccaa	gggtttggca	tttttcccat	tatttttcta	13320
ttatcgattt	ccagtttgat	tccaggtggt	cagagaacac	acttcatgty	atttcagttc	13380
tattaaattt	gttgaggttt	gttacatggc	ccagtatatg	gcaatttttg	tatatgttcc	13440
atgagcactt	gaaaagaatg	cgaattctgc	tgggtctggt	tggagttttc	cagcaatggt	13500
gattbatgat	cttactcatt	gatgggtggg	ctgagtttga	tgtgttctta	cgatggcagc	13560
tttaaccattc	ttgtcaggta	attctaactg	tctgtctatg	tcagtattag	cgctctctaa	13620
ctgtctcadc	aaagctgaga	ttttcctggt	tccccctggt	cctgttggga	tgtgtggttt	13680
tcatttgaaa	tctggacttt	ggagtattgt	gttatgaggc	tttggatctc	atttaaactc	13740
atctcagcga	atttcctctc	ttgccactca	ggaaggagaa	gttgggtggt	tgaatggagc	13800
agagccggtta	ctgcctaaga	attgtttttac	tgggcttccc	ctttctttct	cctttgacta	13860
gagagagcca	gctttttatt	agggctttat	gtttttctbg	gcctgttggg	gtttctgggt	13920
tgacaaaactt	ctccagaacc	aagtctggaa	tggatgaggc	aaaaagaaac	cccgtggaat	13980
gcaactgctgg	gtcgcctcctt	gggtcccaat	gttccctaact	ggtctgcctt	cttctctcca	14040
gcttccagag	tcttcataag	tttgcttttc	gtacaatgtc	cggggttttt	actttacttg	14100
agagaaatag	gtaaaagtaa	ttctactcca	tctttcagga	agcaaaaagcc	cccttgtgta	14160
tttttttaa	ctttcaaaaa	caaaaacaaa	ggcagctgca	acagttaaaga	agctagtaac	14220
acccttggty	ggaaattcaa	gtccaaatac	acattttaag	tttggctagc	cagtgagaac	14280
atcagaatag	ttcagggtttt	aaacaaattt	atatttatga	ttatgcatat	actaaaagct	14340
gaaggcatct	tatatttact	aagcacctat	tttgttcttg	taaaaaagac	agaaltccat	14400
tccttaggaa	atttgacctg	gcagctggag	ctgatccacc	tggccactag	agcacagagc	14460
agggagagta	gtagccctgc	cccagccacc	cctcaagaca	ggattctttc	tctgggaact	14520
gtaggttaaca	ctaaatcggt	ctggaacaca	acaacgaaag	aagaaaggaa	agagaaagaa	14580
agaaaggaa	aaagagagag	agaaggaaag	aagggaggga	gggaaaggaa	gaaggggaa	14640
ggaagggaat	ggaagggaag	gaagggaagga	aaagggaagga	agggaggag	agagggagga	14700
aggaaggaaa	ggaagggaag	gaagggaagaa	ggaaggaaaa	aaagaaagaa	agaagaaaga	14760
aagaaagaca	agaaagaaag	aaagaaagaa	agaaaggga	aagaaaggga	agaggaagaa	14820
aagagaaaga	aagaaagaa	agaaaggaaa	gaaagagaaa	gaaagaaaaa	gaaagagaaa	14880
gaaagagaaa	gacaagaaag	aaaaaggaaa	gaaaagaaag	agaaagaaaa	gaaagaaagg	14940
aaagaaagag	aaagaaagaa	aaagaaagaa	agaaaagaag	aaagagaaag	aaagaaagaa	15000
aaagaaagaa	agaaagaaag	aaagaaaaag	aaaaagaaag	gagaaaatga	cagcaattac	15060
ttttgcaaca	acctaataata	agtttttttaa	aagttaaata	ttctgttcca	tgcattgctg	15120
gatacccttat	aaataacagg	gcatcctatg	acctgaattt	cccaaattat	gagttgaggg	15180
tttgaactag	ttttaaaaaa	caaggaggcc	aggggactg	gctcatgcct	gtaatccag	15240
cactttggga	ggctgaggca	ggtggatcac	gaggtcagga	gctcgagacc	agccttacca	15300
acatagtga	acaccgcctc	tactaaaaat	acaaaatta	gccgggcgtg	atggtgcgca	15360
cctgtaactct	cagctactca	gcaggctgag	gcaggagaat	cgcttgaacc	cagaaggcgg	15420
aggttgacgt	gagccaagat	cacagcattg	cactccagcc	tgggcgacag	agggagactc	15480
cgtcttcaaa	aaaaaaaaaa	aagacaagga	atctgtaaaa	caggcaactgg	aagtatatgc	15540
acttttattt	tcattctatg	ctatccgatg	cctactgeta	tttcccttca	tatttaacct	15600
ccaacagctg	cattttgctc	cctccagacc	acctgatgg	agctcacgtg	ctcccacaca	15660
gtacctccaa	ccagagagag	tcgagtccca	cagaaaggcg	taacaatcac	cagtaatttt	15720
gcacttattt	tacattgtgc	cttgatacag	agtactcaat	gaatgctctt	tgaatcatat	15780
ttaataaata	tgtgtatttg	ggattgtagc	atattgcagc	tacctggata	tataatttaa	15840
ttagaaaaaa	aattttgtgt	ggctcaatca	acaaacgact	tttctctctc	tctctttctc	15900
tttctccctc	tctctctctt	tcttctcagt	tgatgttgc	ggagttcagt	gttgtgcaga	15960
tggcagtgac	aaatgccatg	ggcacatgag	atataataaa	aggtccctga	agaaggtaga	16020
gaaccagtta	tcttatgaaa	ttttccagag	tgggtactgg	atctctcctg	tctggcacca	16080
tgtgtgcctc	agcccaaggg	gaatttcctt	ccagagacag	agggcagtg	ttgaggtggg	16140
gagacagatc	gtaacactga	gacttacatg	aggacaccaa	acagaaaaaa	ggtggcaagt	16200
atagaaaatt	ctttcttctg	gacagttctc	tctgttctaa	cttcagcaaa	attctcccc	16260
cagtggatgc	tattgcacaa	ccctacatat	gctatgtttt	ttcctataca	cacttaccta	16320
tgataaaatg	cattaattag	tcacagtaag	aggttaacaa	caataactag	taataaata	16380
gaacaattca	gtaaaataag	agttacttga	gcacaaacac	taggatatca	tgacagtcaa	16440
tctgatgacc	aagagggcta	ctaagcatct	aaacaggagg	gtaagtgtag	acagcatgga	16500

ES 2 576 928 T3

gacgctggac aaagggatga ttcagtccca ggctgggatg gagcggaagg gcatgatatg 16560
tcatcacgct actaaggcac acaatttaaa atgagtaaat tottatttct agaaatttct 16620
ttttaalatt ttcagactac agttgectac aggtaaactga aaccccagaa agcaaaattg 16680
ttgataagga ggtactactg tacatogtcc tttgaaccaa ctttatcatt tgctagtata 16740
tacatatata cctacataca tacatatata catacctgca cacacctata tgtatacgta 16800
cacacacaca cacgcacaca cacacactca catctactaa tgttagaata agtttgctaa 16860
ataagatgca caacttgta atgtcctaca gagcaataaa accataagca ttggggttat 16920
ctttctact agataaaaat ccattatcat tttcataaag ttttctttac attaacatct 16980
aacttttgca atctagtttt taatcatcat aataggaag caaatgaact gtttctctag 17040
tgaatcaaat atccttgaaa acatacatag toatcttttt ggtttatttt tattttttaga 17100
taaattatth aaagttttaa ataatttaac attcacaata gtttgtagct gtatattttg 17160
acttggctct tcaaacttaa tttgtacttt tatgtatcgt gcttacctca attttttatt 17220
cacttttctt aaactttgct ggatttggtt attatltttg totatttctt ttccttctag 17280
tggtttggga gggtttttta aatccatta ctattgaatg cctattaact tgccccctt 17340
ttctttcaat ctctattccc acggcctgaa gcatgagggc caagctgtct gtaaccgca 17400
gagagatgac ccagggtgta ttcactctc cactgtccac ctatcaccat tcccagcccg 17460
atagctctga agtacggctt tctggggct ctgtggggaa aactagaact ggctgcttca 17520
aggacacctc ctgtttttgc aatggaaaa atgtttctaa attccagttt ctctatgaat 17580
tcaatgacat ggtttaaate tctgtggtgt tcttcaaagt ttttcttctt aataggacct 17640
ctcatgatcc tccaaccacg aataaattc attatcattt ttatatttct tctgtcattg 17700
caaaggaggt tttgaaagag tggaggacgc gctaataaac tcaaaaatcc acactattcc 17760
ttgtttccat ctgttgttca ttcattgttt ccattggcct gtccgctcc tatectcctt 17820
cttagacttg gagctctagc ctcagccagg atagggaaaa gagagatcag actgttactt 17880
tgtctatgta gaaaaggaag acataagaaa ctccattttg atctgtatcc tgaacaattg 17940
ttttcccttg agatgctgtt aatctgtaac tttagcccca acctgtgtct cacagaaata 18000
tgtgttgat ggaatcaaga tttaaaggat ctagggctgt gcagaatgtg ccttgttaac 18060
aacatgttta caggcagtat gcttggtaaa agtcatcgc attctccatt ctogattaac 18120
taggggcaca gtgactgag gaaagccgca gggacctctg cccaggaaaa ctgggtattg 18180
tccaaggttt ctccccactg agacagcctg agatatggcc ttgcccgatg ggaaagatct 18240
gaccgtcccc cagcctgaca ccogtgaagg gtctgcccctg aggaggatta gtaaaagagg 18300
aaggcctctt gcggttgaga taagaggaag cctctgtct cctgcatgcc cctgggaacg 18360
gcatgtctca gtgtaaaacc tgattgtaca ttcgttctat tctgagatag gagaaaaccg 18420
ctctgtggct ggaggcgaga tatgctggcg gcaatgctgc tctgttgttc tttactacac 18480
tgagatgttt gggtgagaga agcataaate tggcctacgt gcacatccag gcatagtacc 18540
ttcccttcaa tttacttgtg acacagattc ctttctcac atgttttctt gctgaccttc 18600
tccccactat caccctgttc tctgcccga tcccccttgc tgaggtagtg aaaaagttaa 18660
tcaataaata ctgagggaa ctagagaccg gtgcccagcc gggctctccg tatgctgagt 18720
gacggctcct tgggcccact gttccttctc tatactttgt ctctgtgtct tatttctttt 18780
ctcagctctc cgtcccactg gacgagaaat acccacaggt gtggaggggc tggacacccc 18840
ttcagaccag gattatcagg gcatttgggg gtctgcaaaa ctaagcccca actcatcgat 18900
ttcacaactt catccagagc cagcctgaac agtagttgcc catgatthct atgccttaat 18960
acgagaagag aacatagggg ctgggtgcca agtaggtaga cagggagggc agggaactct 19020
aagacagagc ttgaggggct cattcctctt gcaaaaatgaa acaaaaacca cagcactgaa 19080
tatgtaaate tcgggtgctg aacccctctt aggatagtaa gccctgacac aattgctgtct 19140
atcttctctt tctctcaagg aagtcaaaaa acacctgcag ccttactgtc ccttggaaa 19200
caagatgaac atctacatth tctaaagtgg gacaagaate tctgttcata tttatgtccc 19260
atgcatttgc acgtggccgg acaaaggact ttgcttctgc cagcacatct gtcttcagat 19320
atgagaggaa acagacacaa cctggaggcg gcaaagaagc agctctttct caagtgacct 19380
cctctatctc cctacttctt ggctaattgg gcagccttga tcttgggaa tccaggacag 19440
atatccactc gtgacaaaact agctggaaga atgacaacca atcaggttcc aagcaccact 19500
ggatgtgaac cacagaatth cctcctctcc ttgtggaatg tcagcttacg tctgacaaaa 19560
aatgtaaaac tgagagagtt acaatcttaa ggaggagtca agctaaagca gaaagaatca 19620
cctactctgg actccagcat gactgctgag ctcaaatata tatagagaga gaaagaacca 19680
caaacttgaa atgggatatg agctacagac tttctgtagt caggtagga aatggccatc 19740
cctcaaacct tgcaaaagc aaacttatgc catctgtccc tetgacatac tgggtgatgt 19800
actgtatgth actgatgtga ggggaacttc ctaaattggc tagtaaatth tggcaaatth 19860
aaagcaaaaa tgatatttct tgaaatgtha catctgagga acattgctaa aataatttht 19920
cagtagtttt caggatgatt tatagatgtg cattgaagtg tgtacttgtg ctctctctct 19980
cctctctctc tctcttctc tctctctctc cgtcttttct ctcttggcc cctcctctcc 20040
ctgactttcc ttcctgtccc ctccacagca gtttatattt ttttctgat aatctaactt 20100
tgctgagggg tcaatgtaaa gcaacctcag tgatgagtha gttggaatgt tccccagaa 20160

ES 2 576 928 T3

attctatttc cagcactcct ttacatgaaa tccaagaagc tctcagacta tcttactgac 20220
 accttgccct tcctcaacag atcaatctta tcaatgtcca tcacagatat tttgtagaac 20280
 ggtggatcct ggcagagtct cacagatgct tctgagacaa catttgcttt caaaaaatga 20340
 accacacaca tcctaaagat ctcagccact tcccattggtt cattttgtgt tacagcaaac 20400
 atcacaacaa tcattcctac agatcaccac tgcattgtgt caataaaata gtttttgcaa 20460
 caatggtact tatgataatc atcttttatt gtttacaat actgctttac aatagttatt 20520
 cggttgcact gttcatatta gatttccaat tagctcactt aggaacataa gtccctcgaa 20580
 cagctcagtc atctttttca ttctgtttc tatcccctac atctctttcc tttgcagacg 20640
 actatctcct acaactgaaac aggaaagctt ttaccttttt ggcatgcttg atttaaagat 20700
 tatagaaaag tatttgacaa agaaaactca cacatgtgtg tacatatctt ttaaaaagtt 20760
 atgtttatgc attgcacagg aatctcgaga atgctaatag gcaatgtcag agtttactgt 20820
 ttttcaaaat tagtacagtt ttattatttc taaaaactat aaaatgaata tattcacatc 20880
 accatacaga agagtaggag gagatggcat aaagtgtcat tgttccctct ctgcaatccc 20940
 aggagataac taccaagcac aatttatgtc ttttaaaatt cagcccgtat ttatatacat 21000
 atatatccaa tgtagatggg atcatgatat ctcaccacac atactcttca gtgacctgca 21060
 ttttcacaaa caccttccac gtaactatat agaagtctac gtcttcccct taatgtctgc 21120
 tttgtgctac attgtaaagc tctagcacag ttttaaccaa ctctatttaa tgaggatttt 21180
 agttattttt cactctttaa acaatatttc catgtgtagt cttatacata cgtctgtaca 21240
 cacttatccc agtctaagga gttcctttta ccttccccca tcccagcatt cctgtcacg 21300
 cttgttgctt ccgttgagtg actttactcc tggagtataa tctgctgata tttcagttaa 21360
 aaacatggga tctgagttta ggtcacagct ctgccactta ctgccataag ccagtctcct 21420
 gacctctctg cctcaagtt tttgcaccta caaagtaggg gataatatta gttcctagtt 21480
 catagagtct tgggaataat taaatgtgat gatccatgta caatgtctgg cacttagtaa 21540
 gtgctcaata aatgtcacc tttatgattg gtattgctg taatgtctgca gagaaaatca 21600
 cttgtgtgcc cctttaaana aggactatgc ccttggctcag ctattttgca cattaaattt 21660
 cacttgccaa tattaactct ccacctctaa cttgatccct ctcttctctc atcttctggt 21720
 gagaccaa at gctaattctg ctattcaagg caactagcaa agctgccagt gacagaatca 21780
 aataaaccta ccctaactct ttagaattgt agttatgatt tctgtgtgaa aagttactgt 21840
 tgtggcagtc agtattagtc tttggtctat gatagcatct ctgatctatt attgaytttc 21900
 aattakgtat ttttttttat ttattctgaa aatgtttggt aagcatttgc taagtaaga 21960
 tactggackg agcctcccaa atacagggca aataaaacat caaacagctt ataatttaga 22020
 agggtagaag agaactctgaa agcaggtaaa aataaacagg cactcggctg ggcgcgggtg 22080
 ctacgcctg taatcccagc actttgggag gccgagggtg gcggatcacg aggtcaggag 22140
 atcgagacca tcctggctaa cacggtgaaa ccccgctctct actaaaaata caaaaaatta 22200
 gcgaggcgtg gtggcgggag cctttagctc cagctagctg ggaggctgag gcaggagaat 22260
 ggtgtgaacc cgggaggcgg agcttgcagt gagccaagat cgcaccactg cactccagcc 22320
 tgggygacag agcgagactc cgtctcaaaa aaaataaata aataaaataa aaaataatta 22380
 ggtactctag gccagtgac ctgtctctgt actctgtaaa ttcaggtcac ctgctcaggg 22440
 ctaactctgag agaaggtctc tcttcagttg aattttgaaa gacaattagc agttcacaag 22500
 ctaaccaggt tggacaaaga gtttcccag cagagggagt gcttgtgaaa gctggaggcc 22560
 atagaaaaac tctaaggagt gtagggaggt gggagtaatg tatggaaggg gtggagatgg 22620
 aaggttaaga gagatacaag gctgcaaaaa tggagctgga ctcaaaagaa aataactgaaa 22680
 aggtcttcag tgttgttgat gagattacta tggaaacact atggaacact gggactccat 22740
 ggcagctcca aagatggcat gcgcctggct cagctcagta agagctgagc tcttctctgt 22800

<210> 101
 <211> 154
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintética

10

<400> 101

tctggcaaca cggcctccct gaccgtctct gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
 tactgcagct catatgcagg cagcaacaat ttaagtcttc ggaactggga ccaaggtcac 120
 cgtcctaggt cagcccaagt ccactccac tctc 154

ES 2 576 928 T3

<210> 102
 <211> 156
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> sintética
 <400> 102
 10
 tcagggacaa tggccacctt gactatcagt ggggccagg tggaggatga agctgactac 60
 tactgttact caacagacag cagtggtaat cattatgtct tcggaactgg gaccaaggtc 120
 accgtcctag gtcagcccaa gtccactccc actctc 156
 <210> 103
 <211> 150
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> sintética
 20
 <400> 103
 tctgggaaca cagccactct gaccatcagc gggacccagg ctatggatga ggctgactat 60
 tactgtcagg cgtgggacag cagcaactgcc gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc 120
 ctaggtcagc ccaagtccac tcccactctc 150
 25
 <210> 104
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> sintética
 <400> 104
 aggtggaac acggtgagag t 21
 35
 <210> 105
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> sintética
 <400> 105
 45
 ccactcgggg aaaagttgga a 21

REIVINDICACIONES

1. Un ratón que comprende:

- 5 (a) un remplazo de uno o más segmentos génicos variables (V_H), de diversidad (D_H) y de unión (J_H) de cadena pesada con uno o más segmentos génicos V_H , D_H , y J_H humanos en un locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón endógeno; y
 (b) un alelo de cadena ligera λ (lambda) endógeno que comprende un segmento génico variable lambda humano ($hV\lambda$) no reordenado y uno de unión lambda humano ($hJ\lambda$) no reordenado,

10 donde el ratón comprende una delección de un primer grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo de cadena ligera λ de ratón endógeno y el remplazo, en su totalidad o en parte, de los segmentos génicos $V\lambda$ - $J\lambda$ del segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo con dichos segmentos génicos $V\lambda$ y $J\lambda$ humanos que están unidos de forma funcional a un gen de región constante λ ($C\lambda$) de ratón intacto de dicho segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de modo que el ratón expresa una cadena ligera derivada de un gen $hV\lambda$, un $hJ\lambda$ y un $C\lambda$ de ratón, donde los potenciadores endógenos Enh 2.4, potenciador 3' lambda de ratón (Enh) y Enh 3.1 se mantienen intactos en dicho alelo de cadena ligera λ .

20 2. El ratón de la reivindicación 1, en el que el alelo de cadena ligera λ (lambda) endógeno comprende una pluralidad de segmentos génicos $V\lambda$ humanos.

3. El ratón de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el alelo de cadena ligera λ (lambda) endógeno comprende:

- 25 (a) al menos 12 segmentos génicos $V\lambda$ humanos no reordenados; o
 (b) de 13 a 28 segmentos génicos $V\lambda$ humanos no reordenados.

4. El ratón de la reivindicación 3, en el que los segmentos génicos $V\lambda$ humanos incluyen

- 30 (a) $hV\lambda$ 3-1, $hV\lambda$ 4-3, $hV\lambda$ 2-8, $hV\lambda$ 3-8, $hV\lambda$ 3-10, $hV\lambda$ 2-11, y $hV\lambda$ 3-12; o
 (b) $hV\lambda$ 2-14, $hV\lambda$ 3-16, $hV\lambda$ 2-18, $hV\lambda$ 3-19, $hV\lambda$ 3-21, $hV\lambda$ 3-22, $hV\lambda$ 2-23, $hV\lambda$ 3-25, y $hV\lambda$ 3-27.

5. El ratón de la reivindicación 1, en el que el alelo de cadena ligera λ (lambda) endógeno comprende un segmento génico $J\lambda$ no reordenado que es $hJ\lambda$ 1.

35 6. El ratón de la reivindicación 1, en el que el alelo de cadena ligera λ (lambda) endógeno comprende cuatro segmentos génicos $J\lambda$ humanos no reordenados.

7. El ratón de la reivindicación 6, en el que los cuatro segmentos génicos $J\lambda$ humanos no reordenados son $J\lambda$ 1, $J\lambda$ 2, $J\lambda$ 3 y $J\lambda$ 7.

40 8. El ratón de la reivindicación 1, en el que el alelo de cadena ligera λ (lambda) endógeno carece de un segmento génico $V\lambda$ endógeno.

45 9. El ratón de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 5 y 8, en el que está delecionado el alelo de cadena ligera κ (kappa) endógeno.

10. El ratón de la reivindicación 1, en el que el alelo de cadena ligera λ de ratón endógeno comprende:

- 50 (a) una secuencia contigua del locus de cadena ligera λ humano que abarca de $V\lambda$ 3-12 a $V\lambda$ 3-1; o
 (b) una secuencia contigua del locus de cadena ligera λ humano que abarca de $V\lambda$ 3-29 a $V\lambda$ 3-1; o
 (c) una secuencia contigua del locus de cadena ligera λ humano que abarca de $V\lambda$ 3-29 a $V\lambda$ 3-1 y una secuencia contigua del locus de cadena ligera λ humano que abarca de $V\lambda$ 5-52 a $V\lambda$ 1-40.

55 11. Una célula aislada que expresa una cadena ligera derivada de un gen $hV\lambda$, uno $hJ\lambda$ y uno $C\lambda$ de ratón, en la que la célula es de, o que se puede obtener de, el ratón de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y en la que la célula comprende:

- 60 (a) un remplazo de uno o más segmentos génicos variables (V_H), de diversidad (D_H) y de unión (J_H) de cadena pesada con uno o más segmentos génicos V_H , D_H , y J_H humanos en un locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón endógeno; y
 (b) un alelo de cadena ligera λ (lambda) endógeno que comprende un segmento génico variable lambda humano ($hV\lambda$) reordenado y uno de unión lambda humano ($hJ\lambda$) reordenado, y una delección de un primer grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo de cadena ligera λ de ratón endógeno y el remplazo, en su totalidad o en parte, de los segmentos génicos $V\lambda$ - $J\lambda$ del segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo con dichos segmentos génicos $V\lambda$ y $J\lambda$ humanos que están unidos de forma funcional a un gen de región constante $C\lambda$ de ratón intacto de dicho segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$, y en la que los potenciadores endógenos Enh 2.4, potenciador 3' lambda de

ratón (Enh) y Enh 3.1 se mantienen intactos en dicho alelo de cadena ligera λ .

12. La célula aislada de la reivindicación 11, en la que la célula es una célula B.

5 13. Una célula madre embrionaria (ES) de ratón aislada que comprende:

(a) un remplazo de uno o más segmentos génicos variables (V_H), de diversidad (D_H) y de unión (J_H) de cadena pesada con uno o más segmentos génicos V_H , D_H , y J_H humanos en un locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón endógeno; y

10 (b) un alelo de cadena ligera λ (lambda) endógeno que comprende un segmento génico variable lambda humano ($hV\lambda$) no reordenado y uno de unión lambda humano ($hJ\lambda$) no reordenado, y una delección de un primer grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo de cadena ligera λ de ratón endógeno y un remplazo, en su totalidad o en parte, de los segmentos génicos $V\lambda$ - $J\lambda$ del segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo con dichos segmentos génicos $V\lambda$ y $J\lambda$ humanos que están unidos de forma funcional a un gen de región constante $C\lambda$ de ratón intacto de dicho segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$, donde los potenciadores endógenos Enh 2.4, potenciador 3' lambda de ratón (Enh) y Enh 3.1 se mantienen intactos en dicho alelo de cadena ligera λ .

14. Un embrión de ratón que comprende, generado a partir de, o que se puede obtener de, la célula ES de ratón de la reivindicación 13, en el que el embrión de ratón comprende:

20 (a) un remplazo de uno o más segmentos génicos variables (V_H), de diversidad (D_H) y de unión (J_H) de cadena pesada con uno o más segmentos génicos V_H , D_H , y J_H humanos en un locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón endógeno; y

25 (b) un alelo de cadena ligera λ (lambda) endógeno que comprende un segmento génico variable lambda humano ($hV\lambda$) no reordenado y uno de unión lambda humano ($hJ\lambda$) no reordenado, y una delección de un primer grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo de cadena ligera λ de ratón endógeno y un remplazo, en su totalidad o en parte, de los segmentos génicos $V\lambda$ - $J\lambda$ del segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo con dichos segmentos génicos $V\lambda$ y $J\lambda$ humanos que están unidos de forma funcional a un gen de región constante $C\lambda$ de ratón intacto de dicho segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$, donde los potenciadores endógenos Enh 2.4, potenciador 3' lambda de ratón (Enh) y Enh 3.1 se mantienen intactos en dicho alelo de cadena ligera λ .

15. Uso de la célula B de la reivindicación 12 para generar un hibridoma que expresa una cadena ligera derivada de un gen $hV\lambda$, uno $hJ\lambda$ y uno $C\lambda$ de ratón, donde el hibridoma es de, o se puede obtener de, el ratón de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la célula comprende:

35 (a) un remplazo de uno o más segmentos génicos variable (V_H), de diversidad (D_H) y de unión (J_H) de cadena pesada con uno o más segmentos génicos V_H , D_H , y J_H humanos en un locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón endógeno; y

40 (b) un alelo de cadena ligera λ (lambda) endógeno que comprende un segmento génico variable lambda humano ($hV\lambda$) reordenado y uno de unión lambda humano ($hJ\lambda$) reordenado, y una delección de un primer grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo de cadena ligera λ de ratón endógeno y el remplazo, en su totalidad o en parte, de los segmentos génicos $V\lambda$ - $J\lambda$ del segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo con dichos segmentos génicos $V\lambda$ y $J\lambda$ humanos que están unidos de forma funcional a un gen de región constante $C\lambda$ de ratón intacto de dicho segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ y en el que los potenciadores endógenos Enh 2.4, potenciador 3' lambda de ratón (Enh) y Enh 3.1 se mantienen intactos en dicho alelo de cadena ligera λ .

16. Un hibridoma que expresa una cadena ligera derivada de un gen $hV\lambda$, uno $hJ\lambda$ y uno $C\lambda$ de ratón, en el que el hibridoma es de, o se puede obtener de, el ratón de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la célula comprende:

50 (a) un remplazo de uno o más segmentos génicos variables (V_H), de diversidad (D_H) y de unión (J_H) de cadena pesada con uno o más segmentos génicos V_H , D_H , y J_H humanos en un locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón endógeno; y

55 (b) un alelo de cadena ligera λ (lambda) endógeno que comprende un segmento génico variable lambda humano ($hV\lambda$) reordenado y uno de unión lambda humano ($hJ\lambda$) reordenado, y una delección de un primer grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo de cadena ligera λ de ratón endógeno y el remplazo, en su totalidad o en parte, de los segmentos génicos $V\lambda$ - $J\lambda$ del segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de dicho alelo con dichos segmentos génicos $V\lambda$ y $J\lambda$ humanos que están unidos de forma funcional a un gen de región constante $C\lambda$ de ratón intacto de dicho segundo grupo génico $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$, y en el que los potenciadores endógenos Enh 2.4, potenciador 3' lambda de ratón (Enh) y Enh 3.1 se mantienen intactos en dicho alelo de cadena ligera λ .

17. Un método de generación de un anticuerpo en un ratón, que comprende:

65 (a) exponer a un ratón de acuerdo con la reivindicación 1 a un antígeno;
 (b) permitir que el ratón desarrolle una respuesta inmunitaria contra el antígeno; y
 (c) aislar del ratón de (b) un anticuerpo que reconozca específicamente el antígeno, o aislar del ratón de (b) una

célula que comprenda un dominio de inmunoglobulina que reconozca específicamente el antígeno, o identificar en el ratón de (b) una secuencia de ácido nucleico que codifique un dominio variable de cadena pesada y/o ligera que se una al antígeno, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera derivada de un gen hV λ , uno hJ λ y uno C λ de ratón.

5

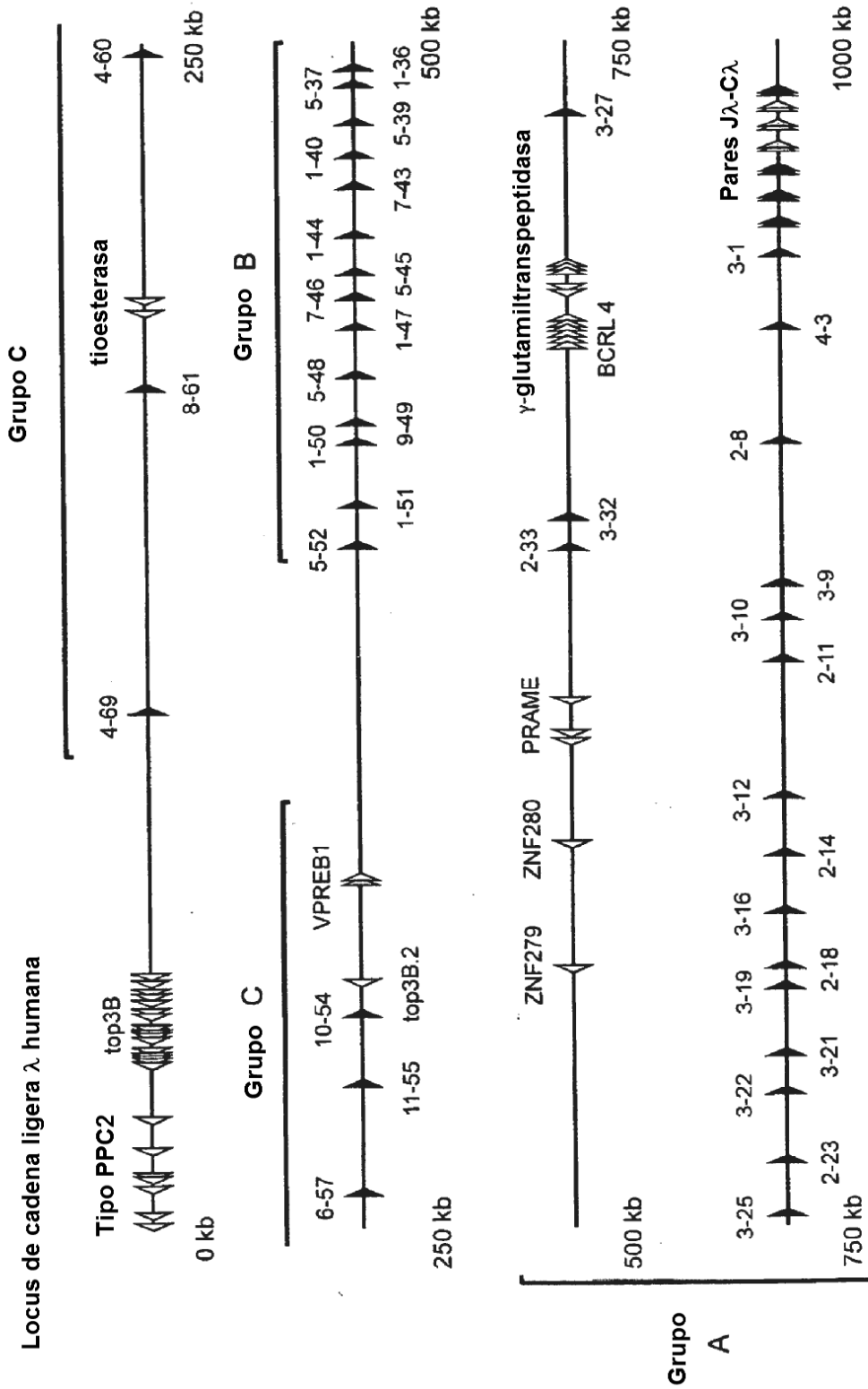


FIG. 1

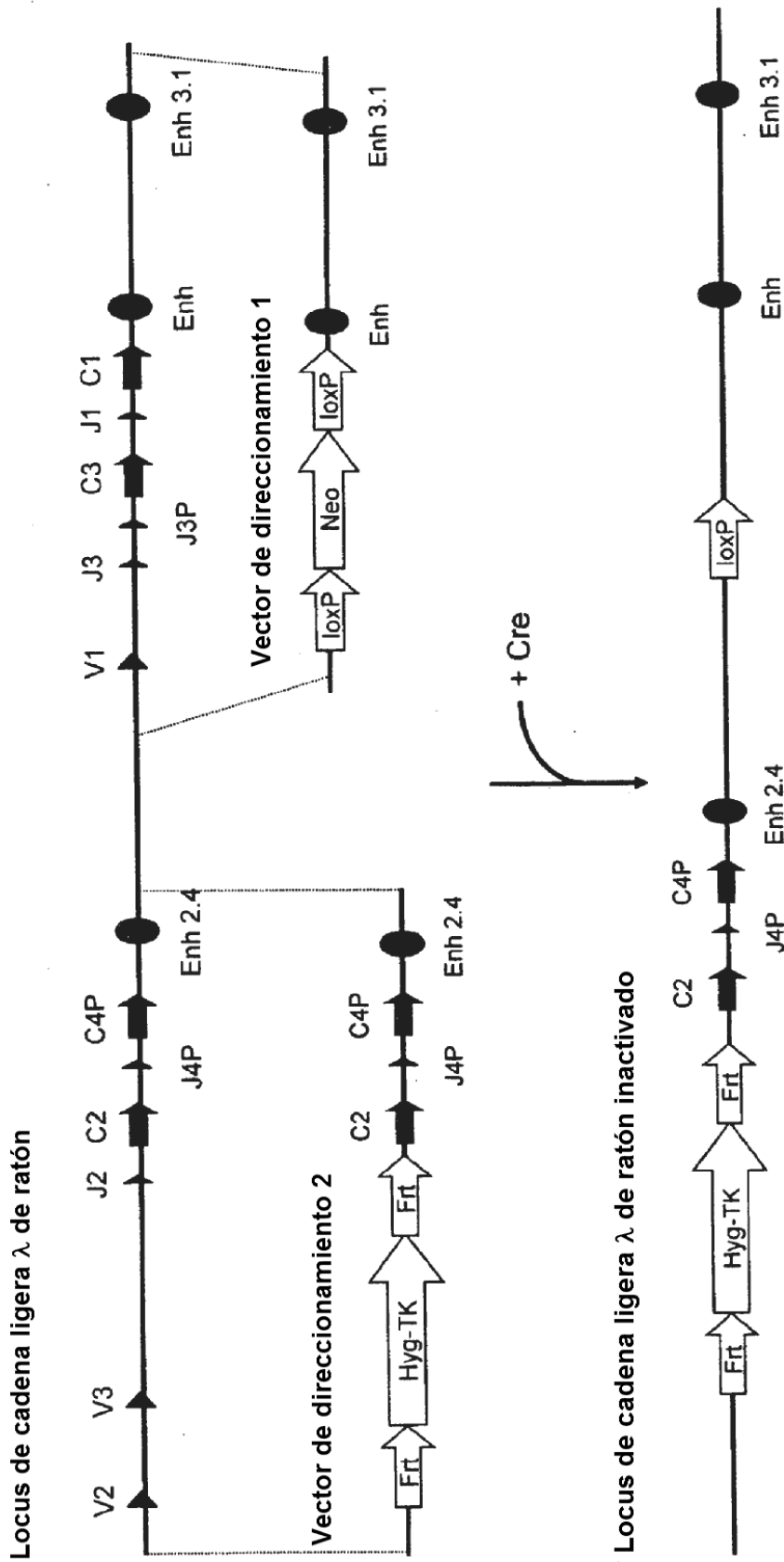


FIG. 2

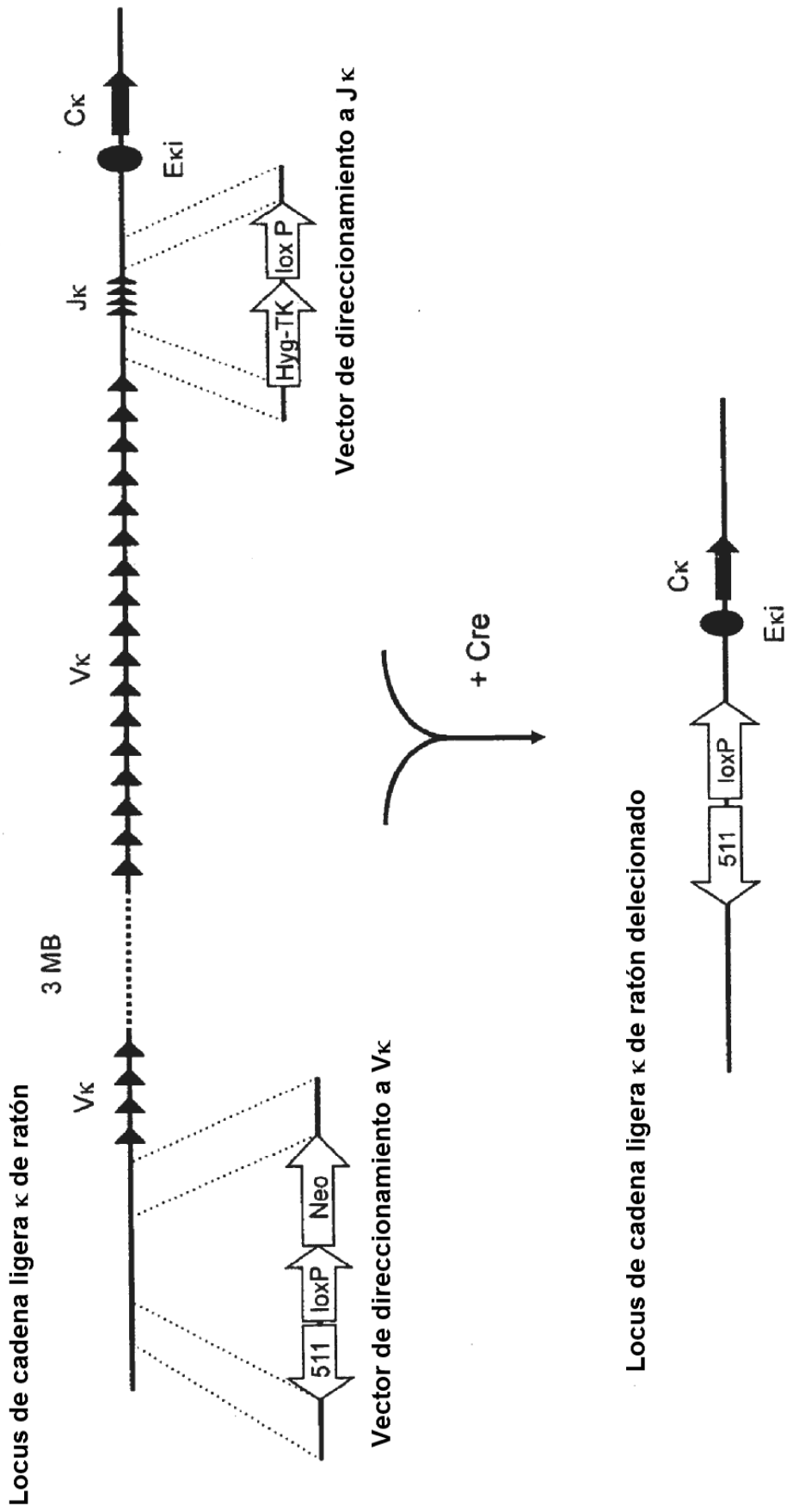


FIG. 3

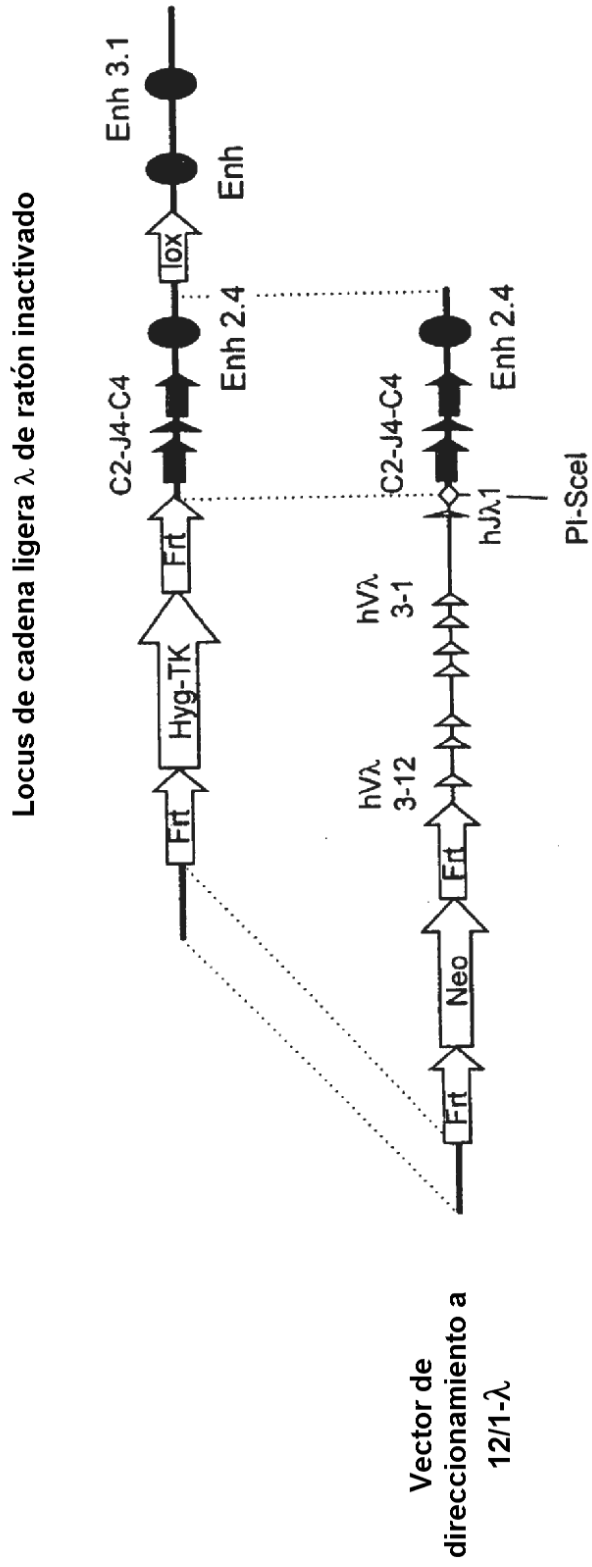


FIG. 4A

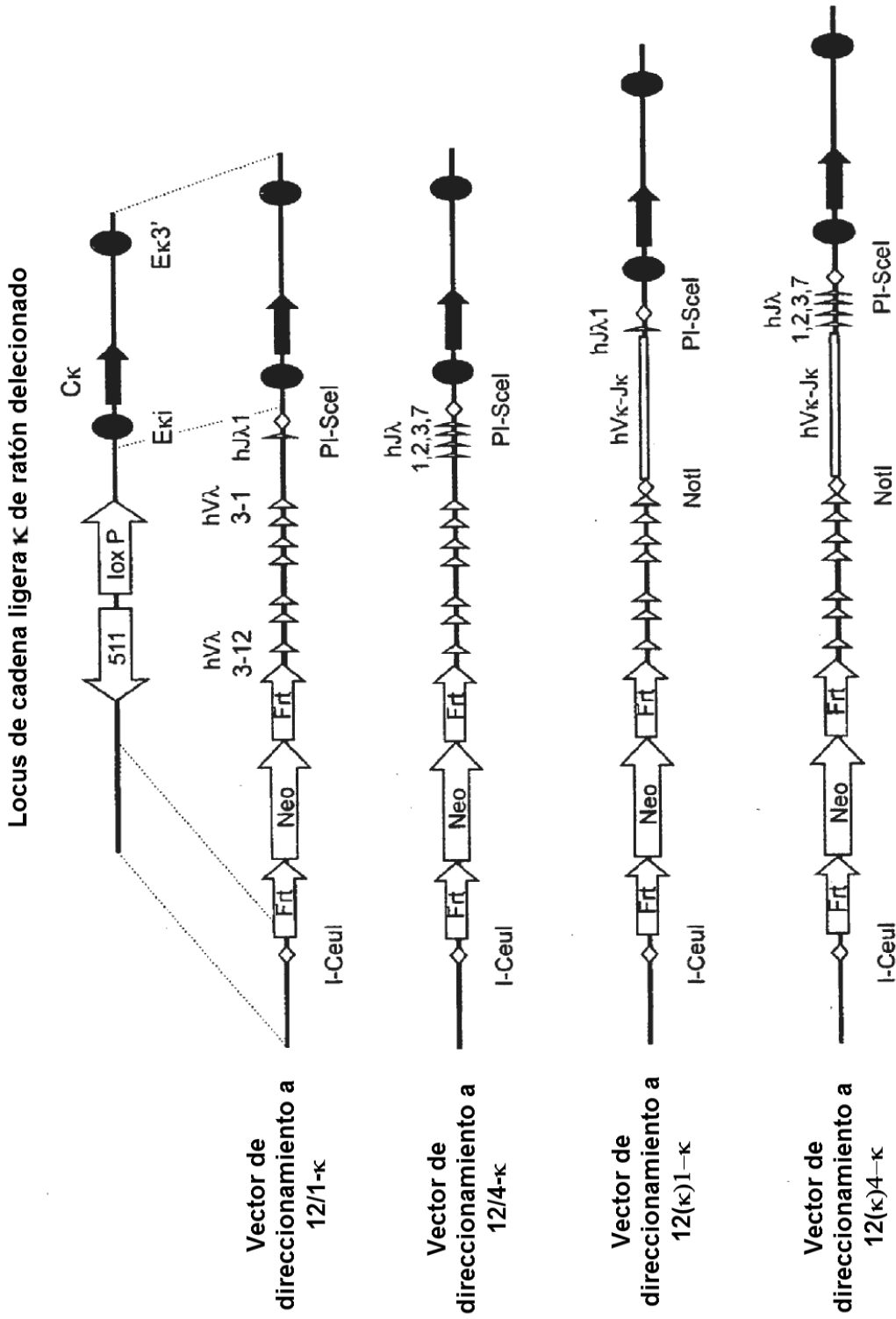


FIG. 4B

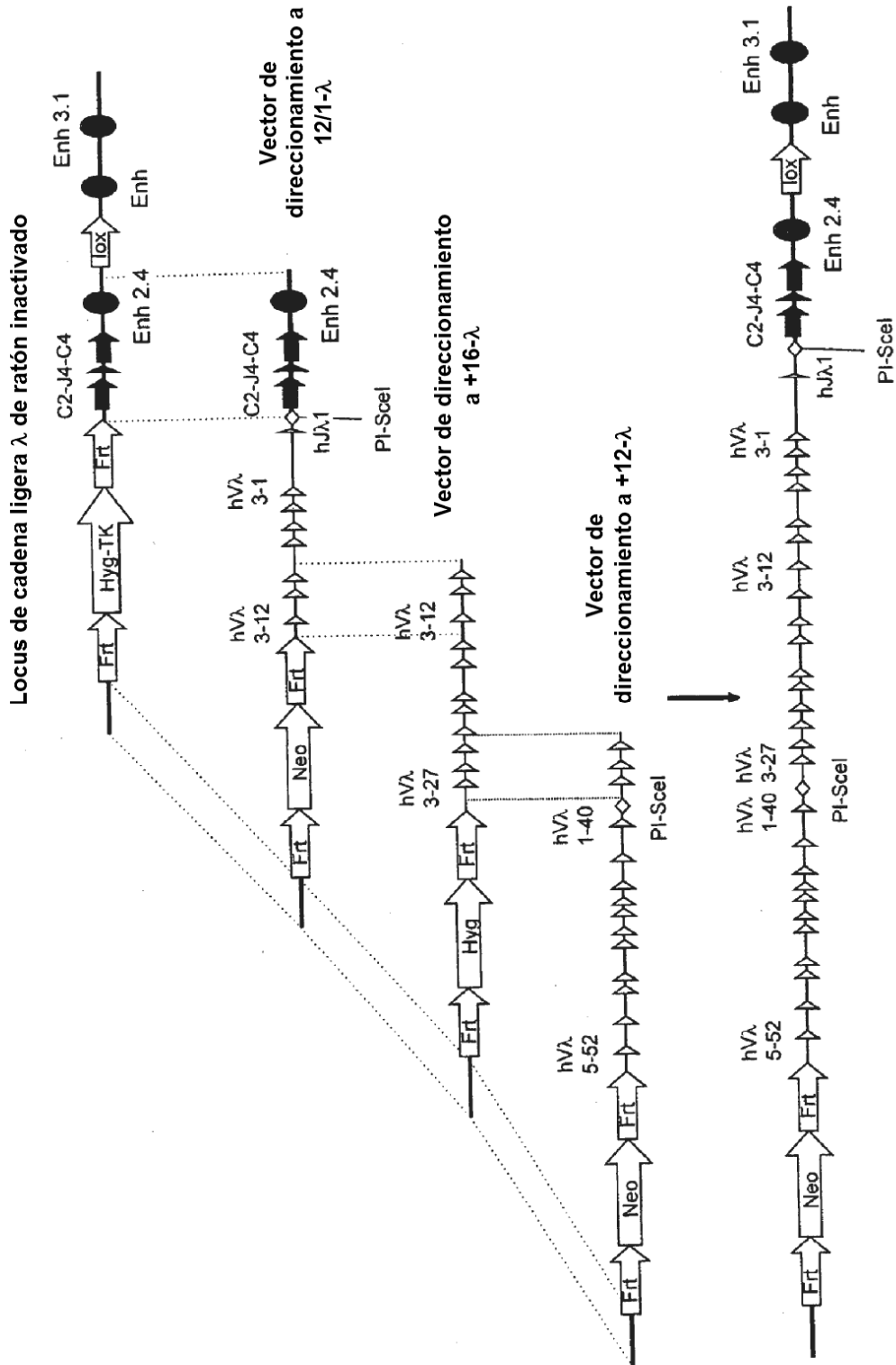


FIG. 5A

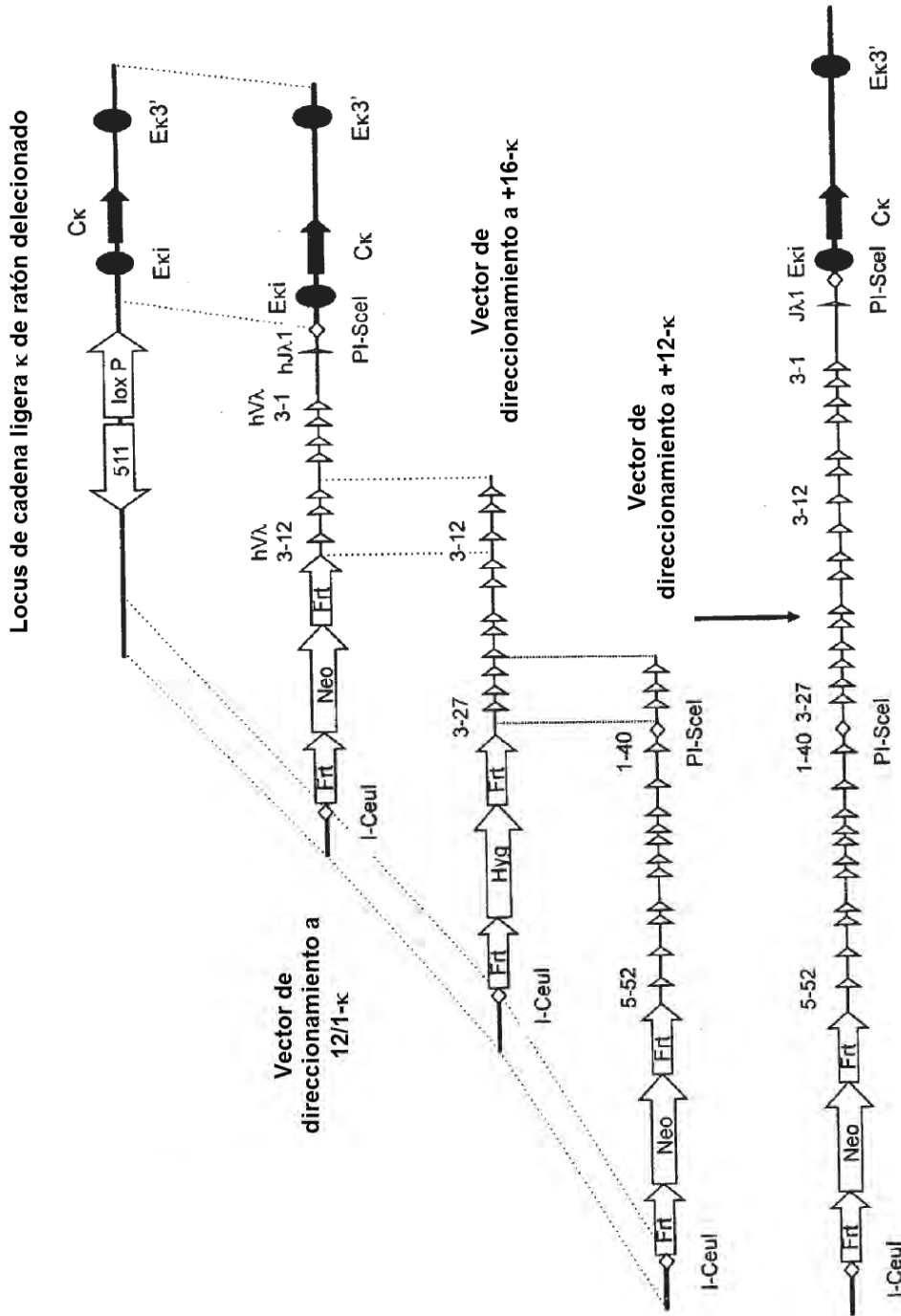


FIG. 5B

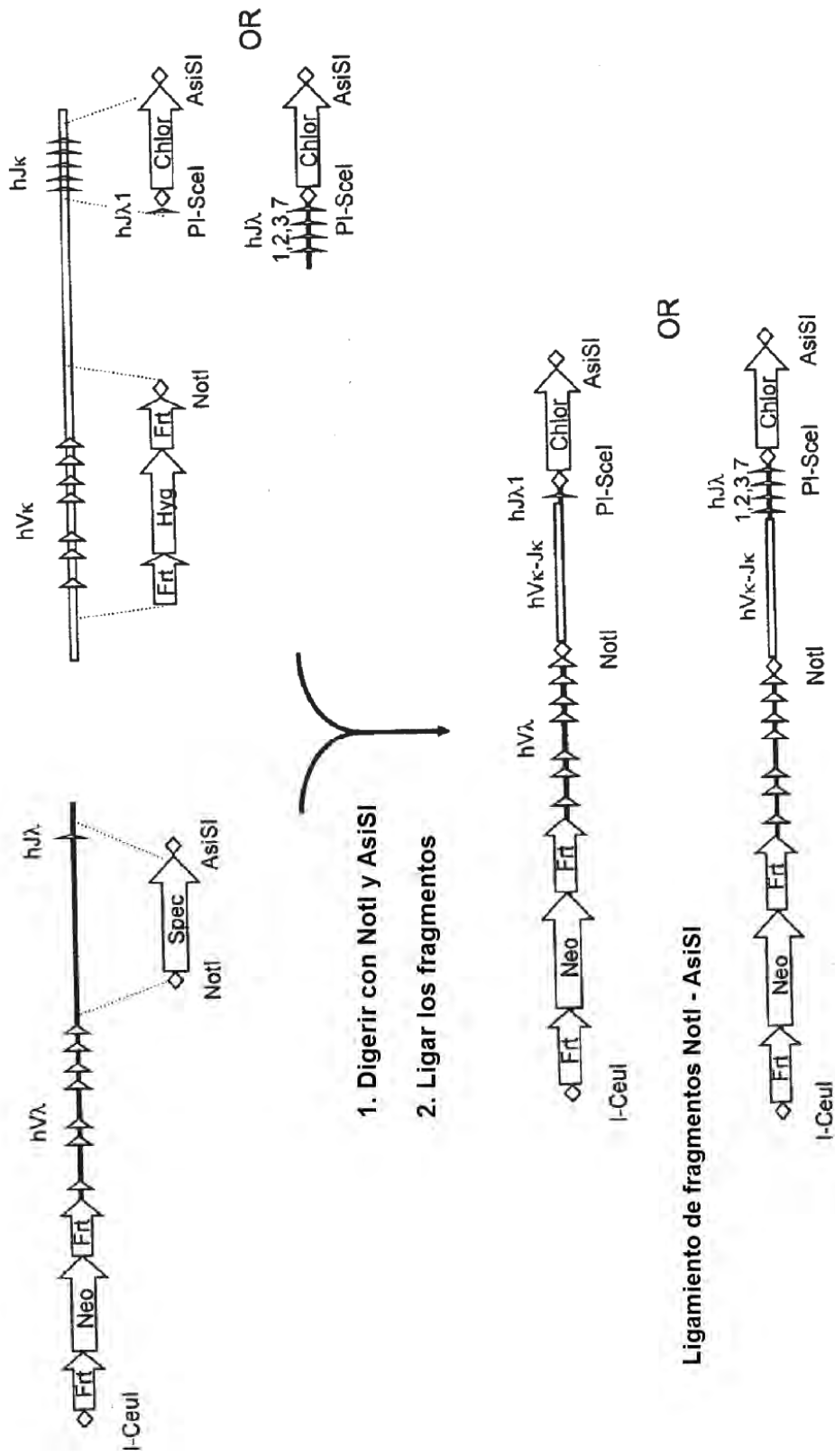


FIG. 6

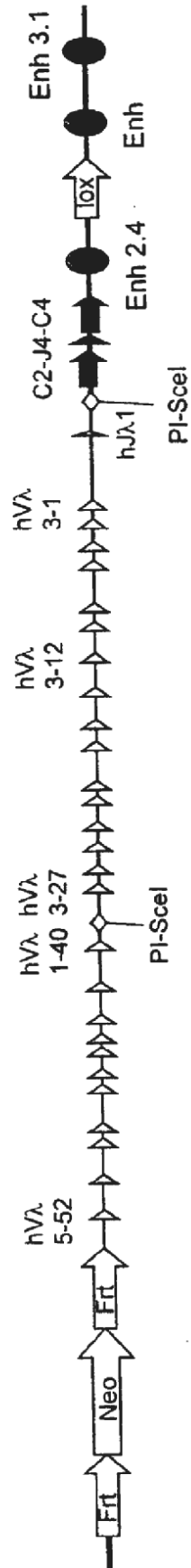


FIG. 7A

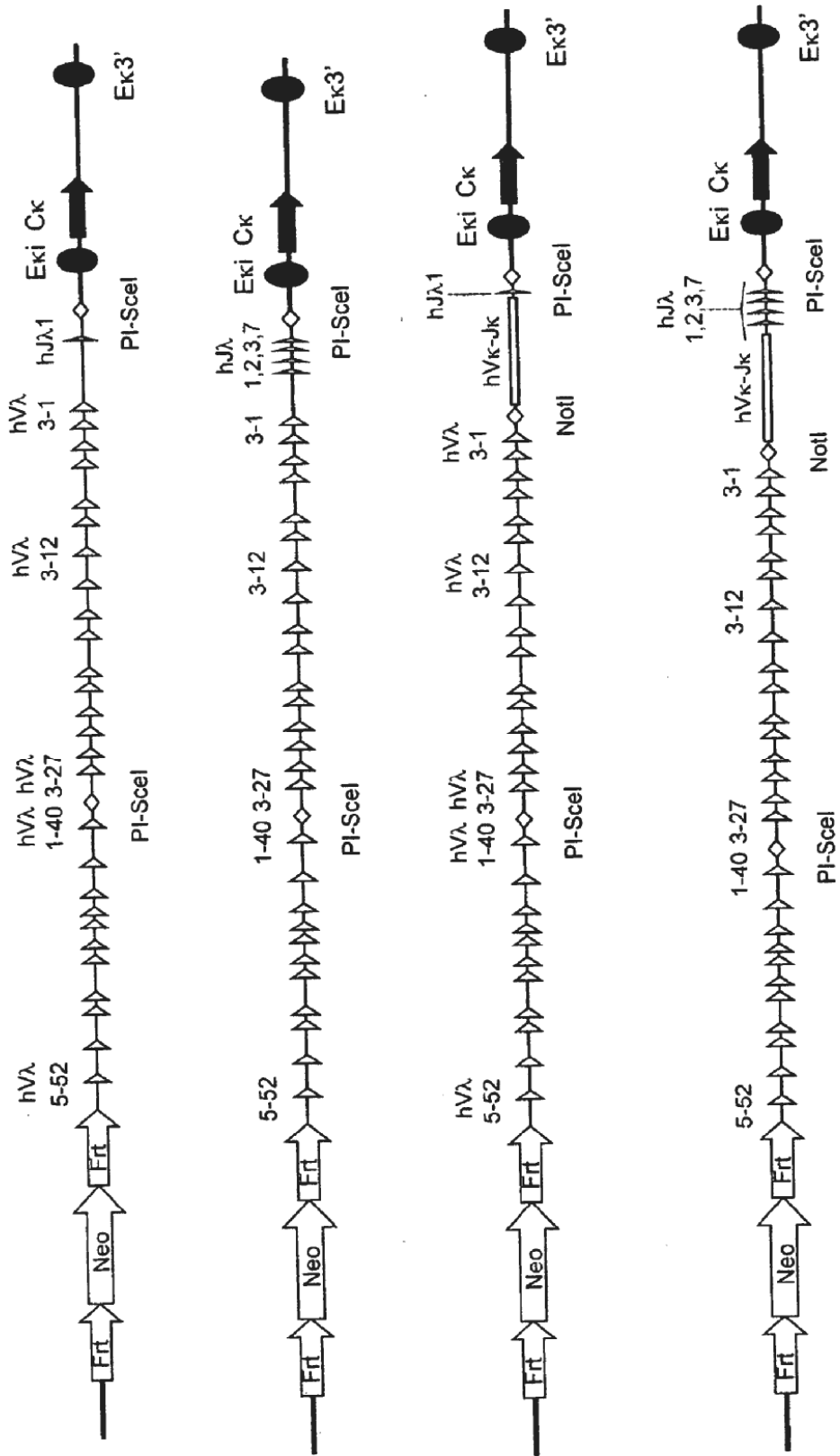


FIG. 7B

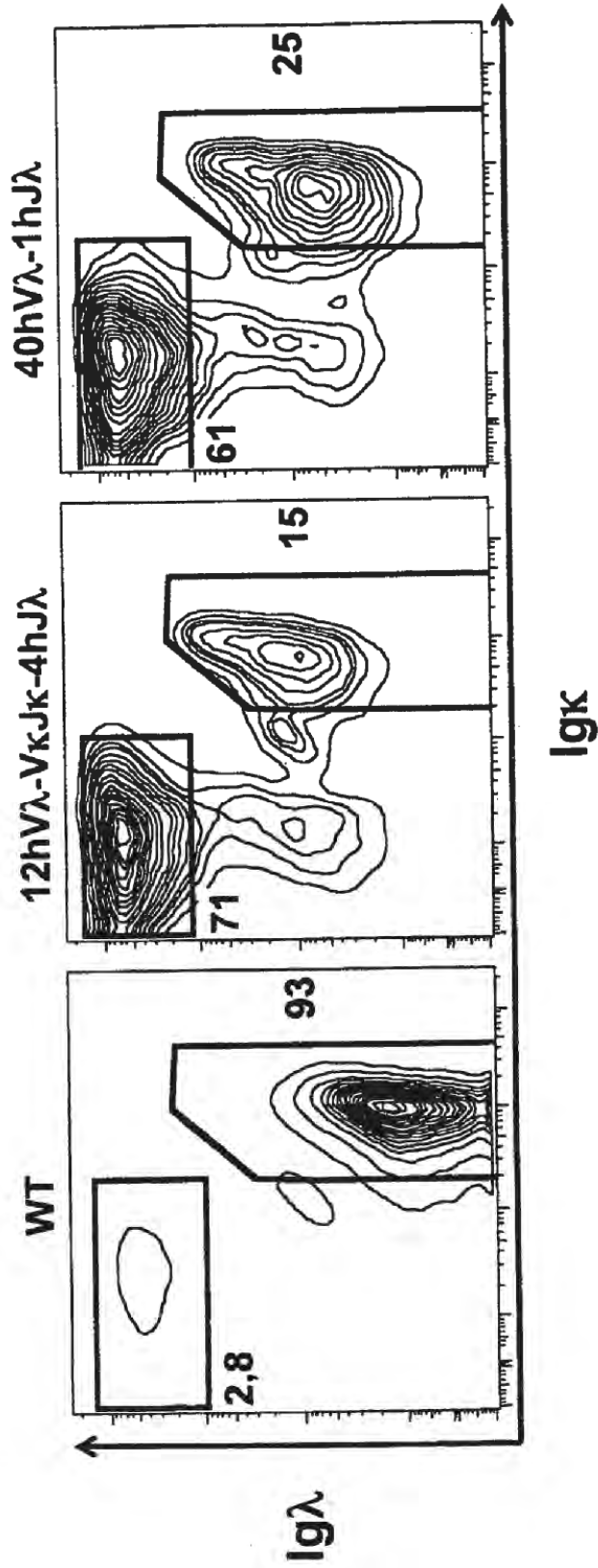


FIG. 8A

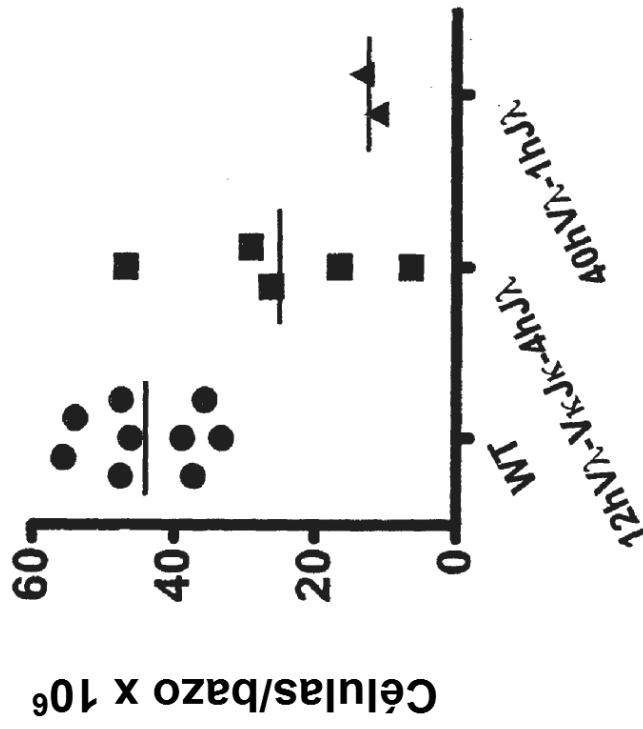


FIG. 8B

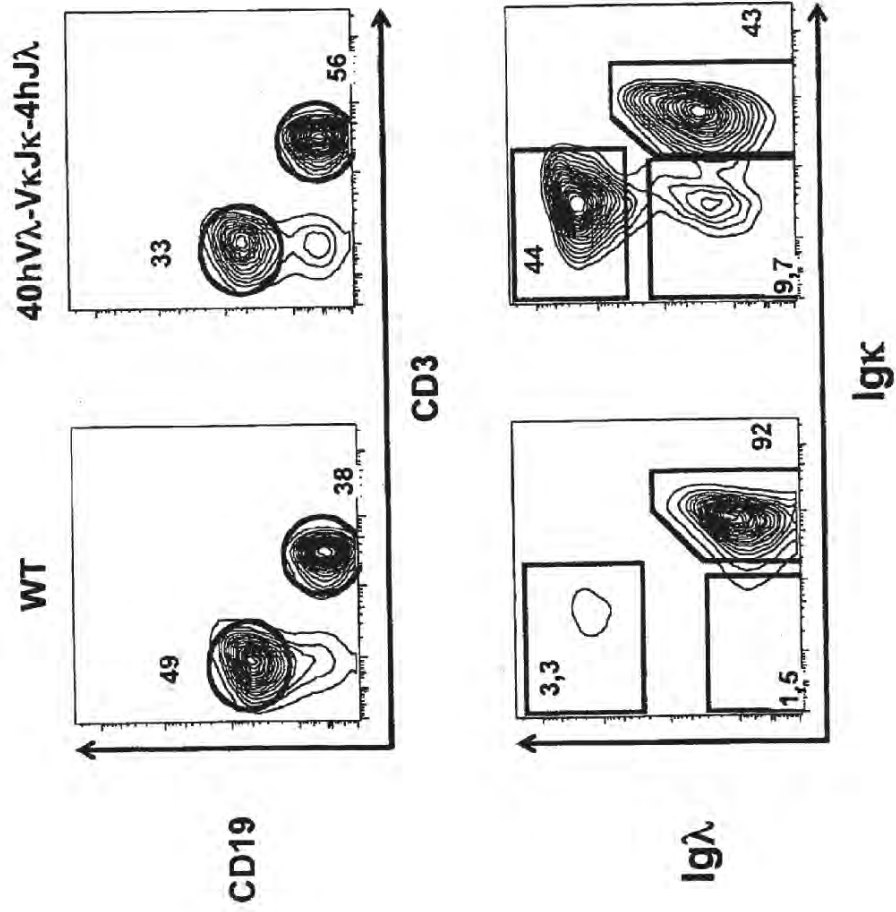


FIG. 9A

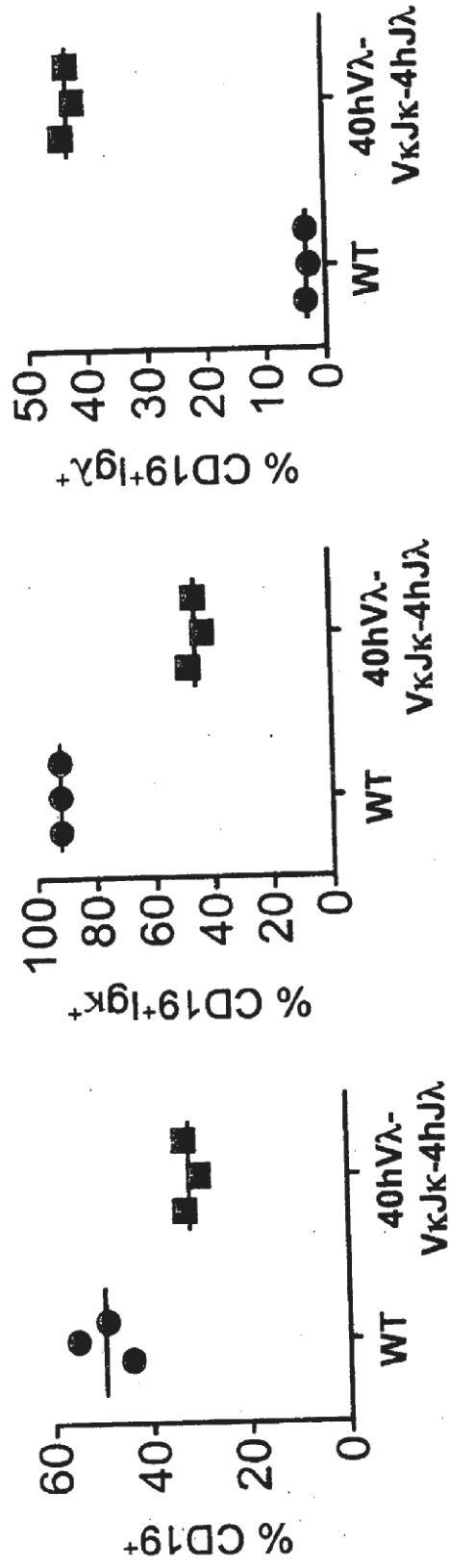


FIG. 9B

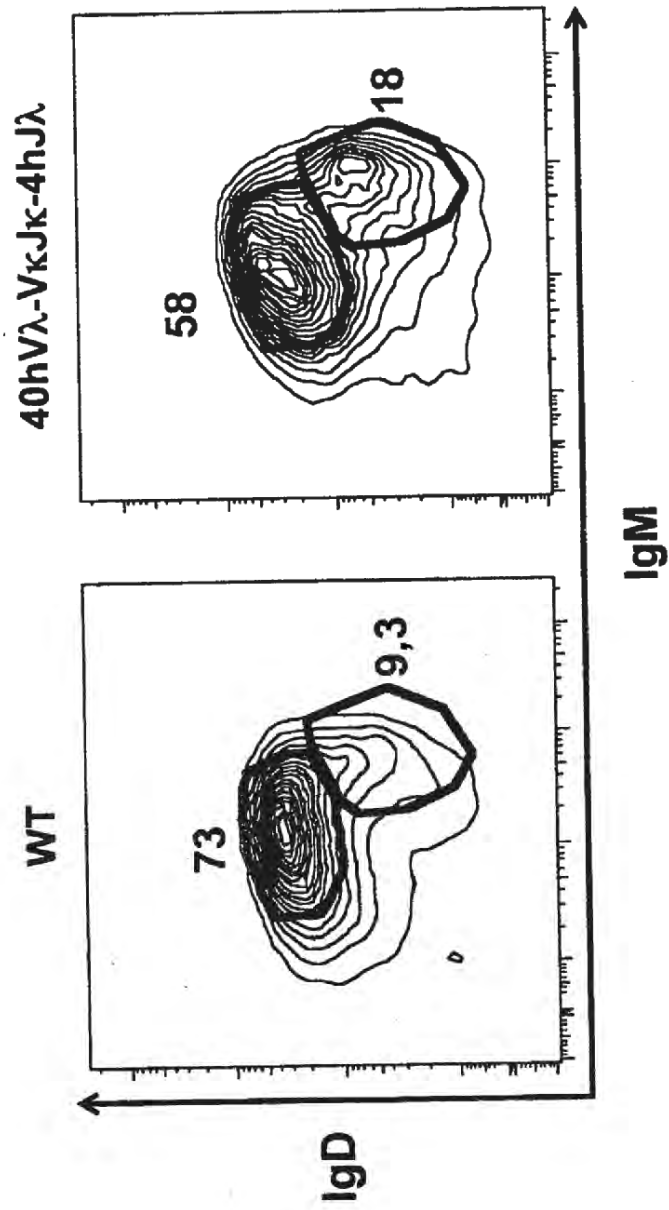


FIG. 9C

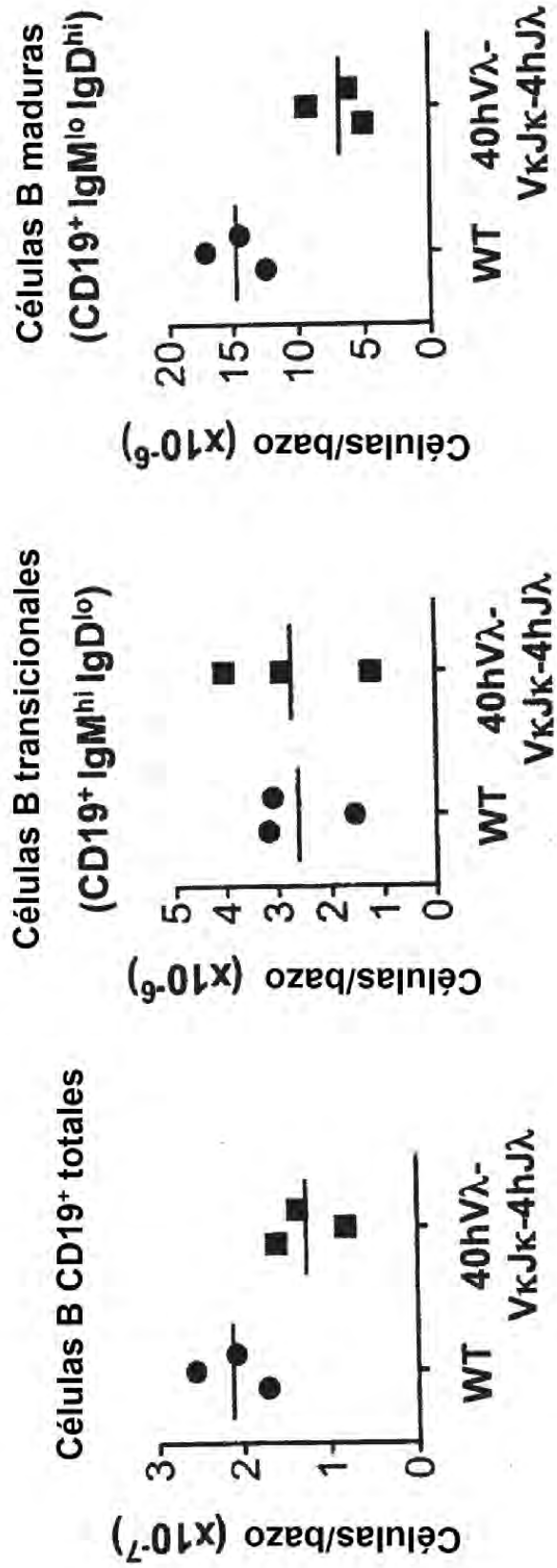


FIG. 9D

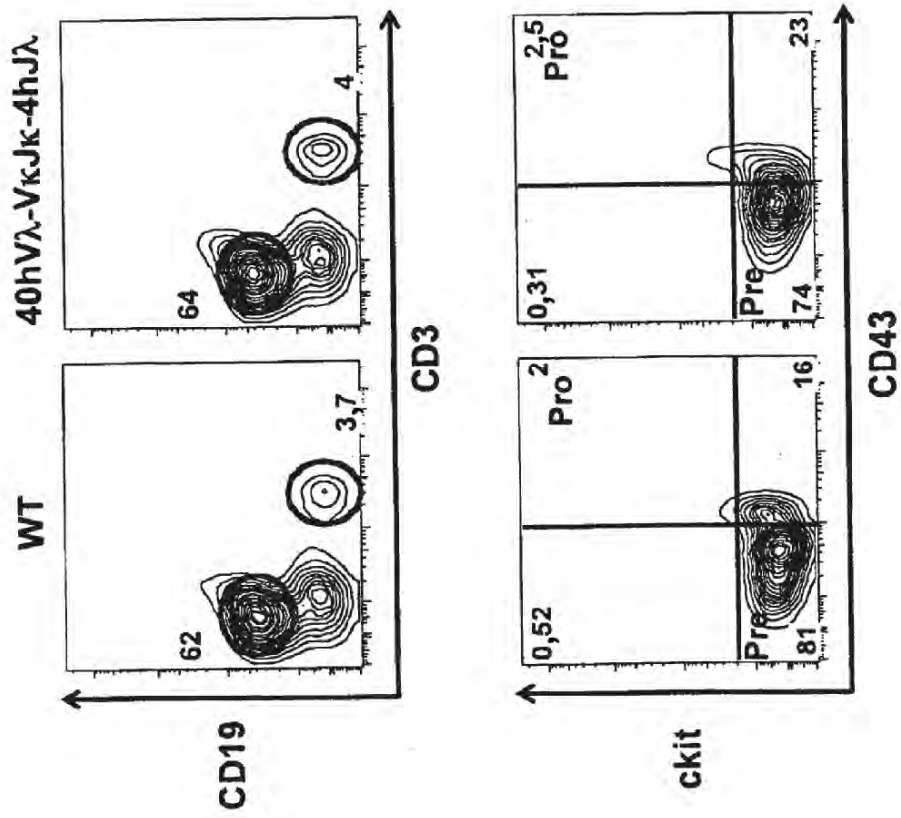


FIG. 10A

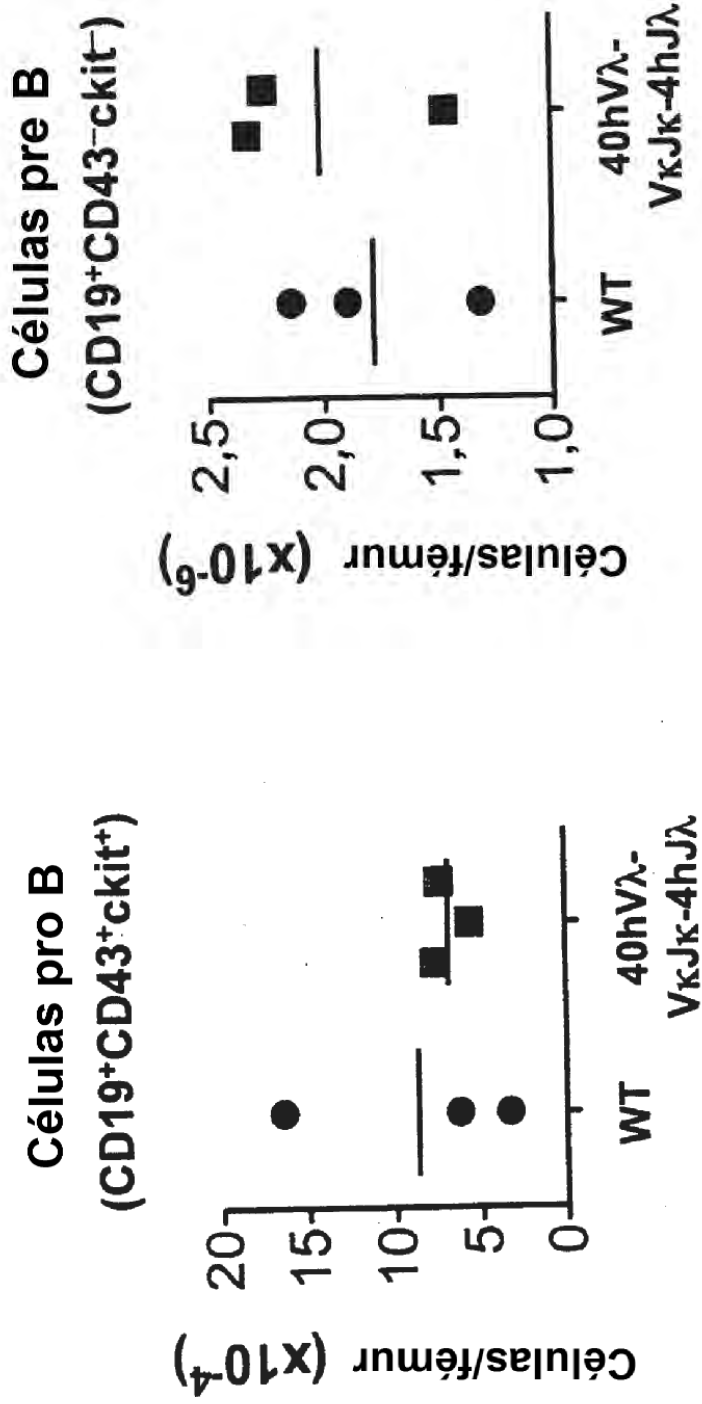


FIG. 10B

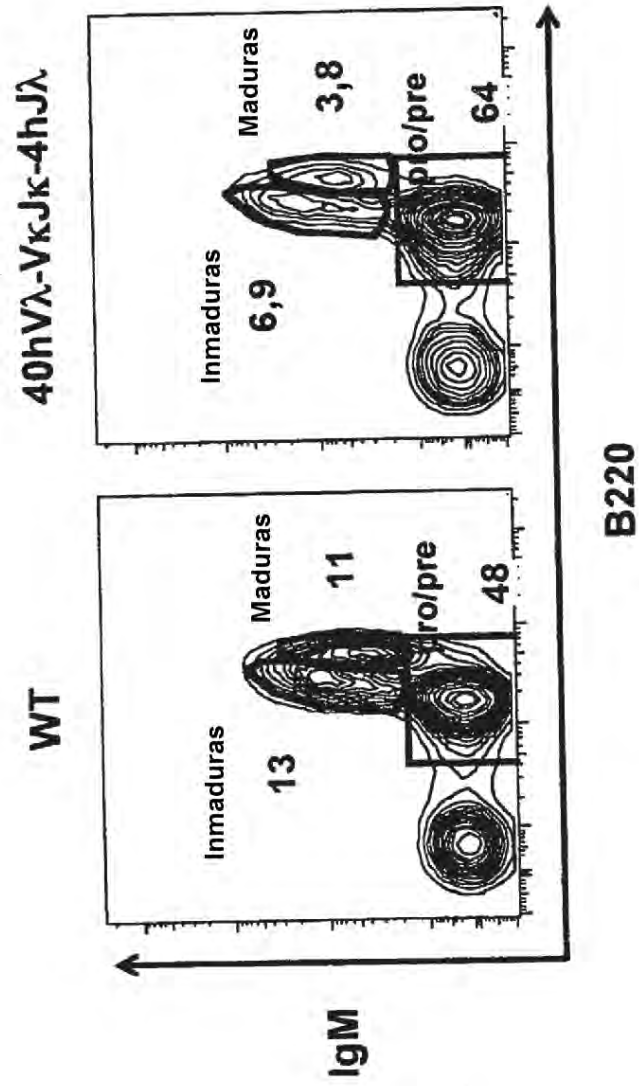


FIG. 10C

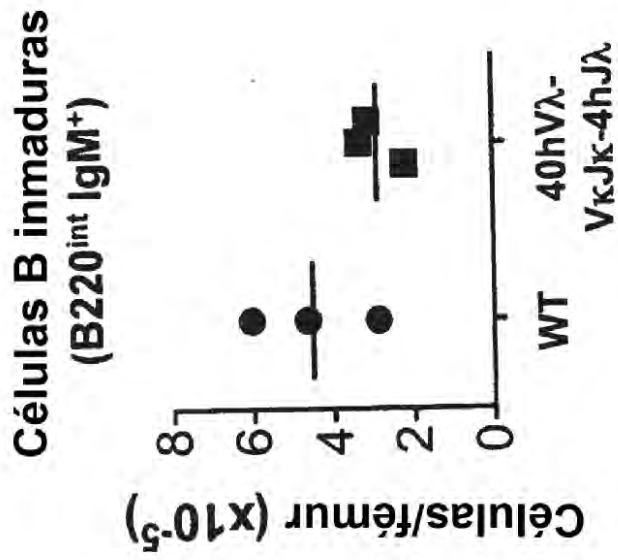
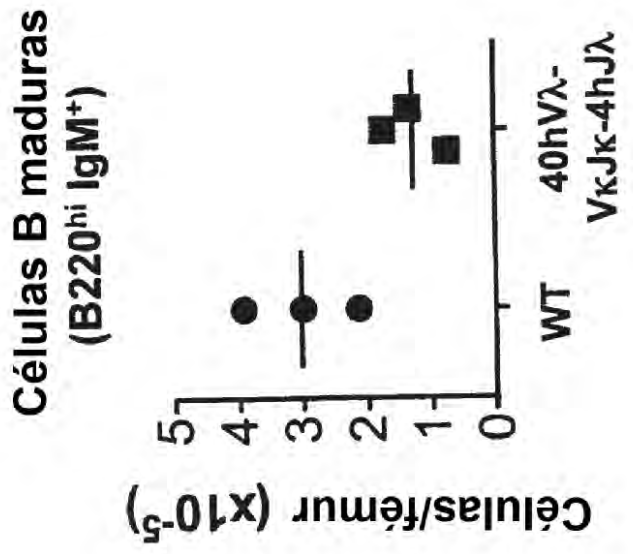


FIG. 10D

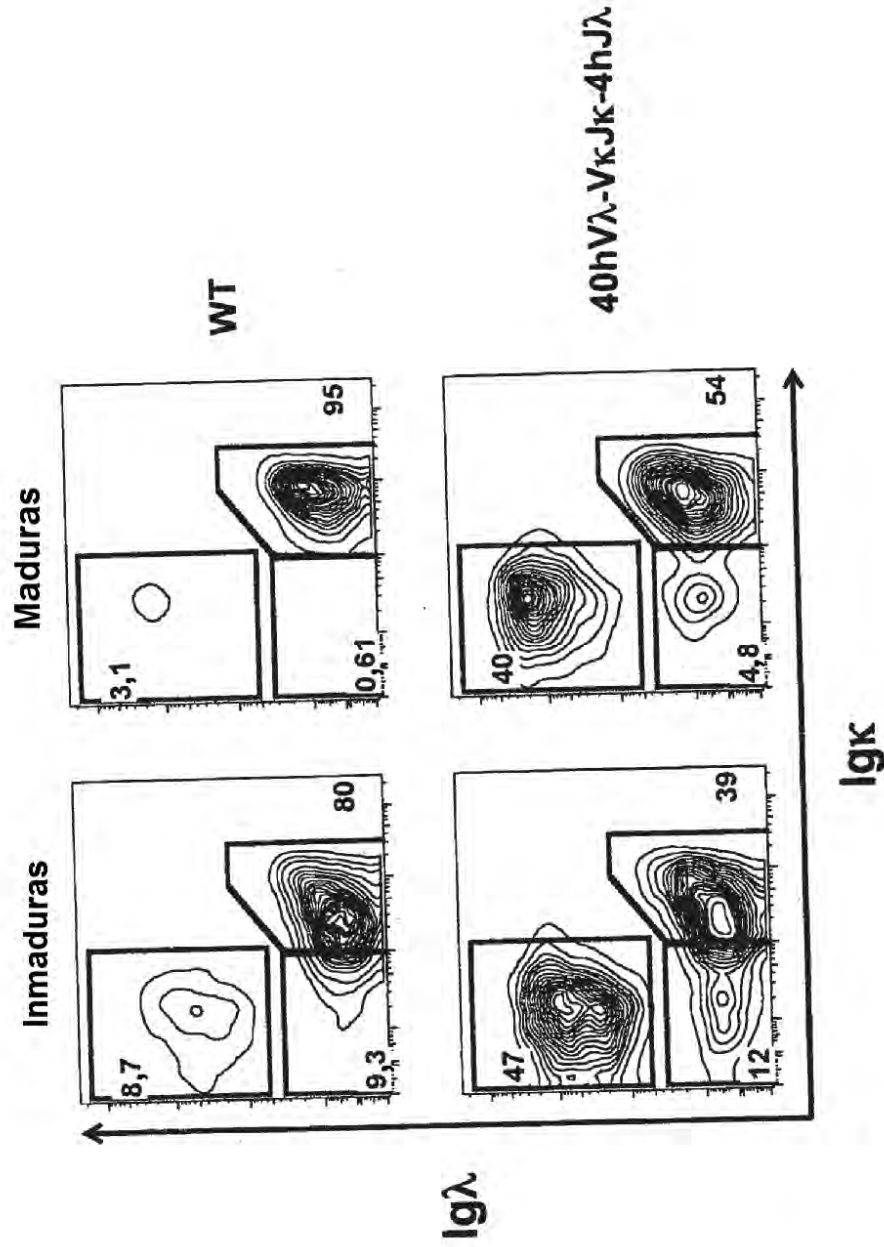


FIG. 10E

	Jλ1 humano	Cκ de ratón 5'
A6	<u>GCAACAATT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC</u>
B6	<u>GCAACAATT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC</u>
F6	<u>GCAACAATT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC</u>
B7	<u>GCAACAATT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC</u>
E7	<u>GCAACAAT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC</u>
F7	<u>GCAACAATT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC</u>
C8	<u>GCAACAATT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC</u>
E12	<u>CAAGTCGGTT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC</u>
1-4	<u>TGAGTGCT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC</u>
1-20	<u>TGAGTGCg</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC</u>
3B43	<u>CTGAATGGT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC</u>
5-8	<u>AGTGGTAAT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC</u>
5-19	<u>AGTGGTGCT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC</u>
1010	<u>AGCAGCACT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC</u>
11A1	<u>AGCAGCGCT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC</u>
7A8	<u>GGTGGTGCT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCC</u>
3A3	<u>AGTAGCACT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC</u>
2-7	<u>AGCAGCACT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCA</u>
FWR4		<u>F G T G T K V T V L G A D A A P T V S I F</u>

FIG. 11

	Jλ humano	Cκ de ratón 5'
5-2	<u>CAGCCTGAGTGGTTC</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC</u>
2-5	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCCTCGGAAC TGGACCAAGGTCACCGTCCTAG GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
1-3	CAGCCTGAATGGT	GCTGTGTTCCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCCGCCCTCG GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4B-1	CAGCCTGAGTGGTC	GGGTGTTCCGGAGGAGGCACCAAGCTGACCCGTCCTAG GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
3B-5	CAGCAGCACTGC	TGTGTTCCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCCGCCCTCG GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
7A-1	CAGCAGTGGTAAT	GCTGTGTTCCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCCGCCCTCG GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-1	CAGCAGTGGTAATCATAG	GGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCCGTCCTAG GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4A-1	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCCTCGGAAC TGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
11A-1	CAGCAGCGCT	GTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCCGTCCTAG GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-7	CTACTATGGTGGTGCTC	GGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCCGTCCTAG GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-4	CTCCTATAGTGGTGCCTCGa	GTAATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCCGTCCTAG GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-3	GAGCAACTTCGTGT	CTGTGTTCCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCCGCCCTCG GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
FWR4		F G G G T K L T V L G A D A A P T V S I

FIG. 12

	Vλ humano 3'	Jλ1 humano	Cλ2 de ratón 5'
2D1	<u>GCAGGCAGCAACAATTa</u>	<u>aGTC TTCGGA ACTGGGACCAAGGTCACCGTCCCTAG</u>	<u>GTCAGCCCCAAGTCCACTCCCACACTCTC</u>
2D9	GACAGCAGTGGTAATCAT	TATGTCTTCGGA ACTGGGACCAAGGTCACCGTCCCTAG	GTCAGCCCCAAGTCCACTCCCACACTCTC
3E15	GACAGCAGCACTGCC	GTC TTCGGA ACTGGGACCAAGGTCACCGTCCCTAG	GTCAGCCCCAAGTCCACTCCCACACTCTC
FWR4		F G T G T K V T V L G Q P K S T P T L	

FIG. 13