

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 376**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2010** **PCT/US2010/059845**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2011** **WO11072204**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2010** **E 10790825 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016** **EP 2509409**

54 Título: **Ratones que producen anticuerpos de cadena pesada**

30 Prioridad:

10.12.2009 US 285250 P

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

29.12.2016

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 y
MURPHY, ANDREW, J.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 595 376 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 producen anticuerpos de cadena pesada

5 Campo de la invención

El campo de la invención es ratones genéticamente modificados que producen anticuerpos de cadena pesada, en particular ratones genéticamente modificados que comprenden una delección de la secuencia de nucleótidos en una secuencia que codifica un dominio CH1 (o dominio CH1 y región bisagra) de un gen de inmunoglobulina gamma (IgG), pero que son capaces de expresar una IgM que no carece de un dominio CH1 funcional, y en particular ratones que son capaces de producir moléculas de IgM no mutantes (es decir, con dominios CH1) pero que producen anticuerpos de IgG de la cadena pesada que carecen de un dominio CH1 funcional (o dominio CH1 y región bisagra).

15 Antecedentes

En la mayoría de los animales, las cadenas pesadas de la inmunoglobulina normales solo se expresan bien cuando se acoplan con sus cadenas ligeras relacionadas. En seres humanos, las cadenas pesadas solitarias se encuentran en la enfermedad de la cadena pesada que se manifiesta por cadenas pesadas disfuncionales que carecen de secuencias de los dominios pesados variables, el CH1, o los dominios pesados variables y CH1. Cadenas pesadas que carecen de cadenas ligeras se encuentran en ciertas especies de peces y en camellos. Tales cadenas pesadas carecen de un dominio CH1 funcional y tienen características no humanas en sus dominios variables de la cadena pesada. Se han hecho intentos por producir anticuerpos camelizados modificando ratones para expresar genes camelizados que imitan a los dominios VHH encontrados en camellos o ciertas especies de peces, en parte por la eliminación de dominios CH1 de IgM y IgG y que conforman las regiones variables de la cadena pesada para parecerse a aquellas de camellos y/o ciertas especies de pescado. Sin embargo, cabría esperar que los anticuerpos camelizados indujeran respuestas inmunitarias en animales distintos de camello.

Hay una necesidad en la materia de animales no humanos genéticamente modificados que produzcan anticuerpos de cadena pesada que tienen dominios VH no de camélido.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra un locus de IgG1 no mutante en un ratón (IgG1, arriba), que muestra el segmento de gen de la región JH que se fusiona con un segmento de gen de CH1, seguido de una región bisagra, un segmento de gen de CH2 y un segmento de gen de CH3; un locus de IgG1 elegido como diana con una construcción que elimina un dominio CH1 (IgG1 Δ CH1, centro); y un locus de IgG1 elegido como diana con una construcción que deleciona tanto un dominio CH1 como una región bisagra (IgG1 Δ CH1- Δ bisagra, abajo).

La Figura 2 ilustra el direccionamiento de un gen de IgG1 de ratón para producir un locus genéticamente modificado que expresa una IgG1 que carece de un dominio CH1.

La Figura 3 ilustra el direccionamiento de un gen de IgG1 de ratón para producir un locus genéticamente modificado que expresa una IgG1 que carece de un dominio CH1 y que carece de una región bisagra.

La Figura 4 ilustra el direccionamiento de un locus de la región constante de la cadena pesada de ratón para producir un locus genéticamente modificado que expresa una IgG1 que carece de un dominio CH1, y no expresa una IgG2b o una IgG2a.

La Figura 5 ilustra una región constante de la cadena pesada de ratón elegida como diana con una construcción que deleciona un dominio CH1 y deleciona una región bisagra y que deleciona un gen de IgG2b y un gen de IgG2a.

La Figura 6 ilustra una región constante de la cadena pesada de un ratón genéticamente modificado que tiene una IgG1 que carece de un dominio CH1 o carece de un dominio CH1 y una región bisagra (arriba), y una región constante de la cadena pesada de un ratón genéticamente modificado que tiene una IgG1 que carece de un dominio CH1 o carece de un dominio CH1 y una región bisagra, y que carece de un gen de IgG2a y carece de un gen de IgG2b (abajo).

La Figura 7 muestra transferencias Western de sobrenadantes de células CHO a partir de células CHO manipuladas por ingeniería para expresar independientemente anticuerpo de cadena pesada de control (fusión del ectodominio de citocina con una Fc de ratón), quimérico (VR humana)/(Fc de ratón) que carece de un dominio CH1 (hVR-mFc Δ CH1), anticuerpo de cadena pesada quimérico camelizado (VR humana)/(Fc de ratón) que carece de un dominio CH1 (hVR*-mFc Δ CH1), anticuerpo de cadena pesada quimérico (VR humana)/(Fc de ratón) (hVR-mFc), anticuerpo de cadena pesada quimérico camelizado (VR humana)/(Fc de ratón) (hVR*-mFc), mFc con (mFc) o sin (mFc Δ CH1) un dominio CH1.

La Figura 8 muestra imágenes de transferencia Western de una SDS-PAGE reductora de sueros de ratón de un ratón no mutante (izquierda) y de un ratón genéticamente modificado cuya IgG1 carece de un dominio CH1 y carece de una región bisagra (heterocigótica) (derecha), transferida con IgG anti-ratón; se proporcionan esquemas de las cadenas pesadas, ya que son posiciones de marcador de peso molecular.

La Figura 9 muestra imágenes de transferencias Western de una SDS-PAGE no reductora de sueros de ratón de un ratón no mutante (WT) y cuatro ratones genéticamente modificados cuya IgG1 carece de un dominio

CH1 y carece de una región bisagra (homocigótica; indicada como HO 1, HO 2, HO 3, HO 4, respectivamente), transferida con IgG anti-ratón; cada ratón (WT o HO) se representa por dos carriles indicados por corchetes encima de los carriles correspondientes a diluciones 1:5 y 1:10 de suero para cada animal (carriles consecutivos de izquierda a derecha para cada uno).

La Figura 10 proporciona un diagrama esquemático de un anticuerpo de IgG1 normal (izquierda) y un anticuerpo de cadena pesada que carece de un dominio CH1 y carece de una región bisagra.

La Figura 11 muestra ensayos de inmunoglobulina en suero de IgG1 y IgG2b separados de ratones no mutantes (WT) y ratones genéticamente modificados que contienen una IgG1 que carece de un dominio CH1 y que carece de una región bisagra (HO; ratón homocigótico que expresa un anticuerpo de cadena pesada que carece de un dominio CH1 y carece de una región bisagra). El control es suero humano reunido.

La Figura 12 muestra las secuencias de proteínas de once clones de RT-PCR independientes amplificados a partir de ARN de esplenocitos de ratones que llevan secuencias de genes de la cadena pesada de ratón en un locus de cadena pesada de ratón endógeno modificado que carece de secuencias de la región CH1 y región de IgG1. B1 = SEQ ID NO:19; B2 = SEQ ID NO:21; B3 = SEQ ID NO:23; B5 = SEQ ID NO:25; D2 = SEQ ID NO:27; D5 = SEQ ID NO:29; D6 = SEQ ID NO:31; E2 = SEQ ID NO:33; E8 = SEQ ID NO:35; E10 = SEQ ID NO:37; F6 = SEQ ID NO:39. Las bases en minúscula indican bases no de la línea germinal resultantes de o bien mutación y/o adición de N durante la recombinación. Los puntos representan huecos artificiales en la secuencia para el apropiado alineamiento de la región estructural (FR) y regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que están indicados encima de las secuencias. Se muestran para cada clon los nueve primeros aminoácidos de la región CH2 de la región constante (CH2) de IgG1 endógena.

La Figura 13 muestra las secuencias de proteínas de siete clones de RT-PCR independientes amplificados a partir de ARN de esplenocitos de ratones que llevan secuencias de genes de la cadena pesada humana en un locus de cadena pesada de ratón endógena modificada que carece de una secuencia de la región CH1 de IgG1. A8 = SEQ ID NO:51; C2 = SEQ ID NO:53; D9 = SEQ ID NO:55; C4 = SEQ ID NO:57; H8 = SEQ ID NO:59; A5 = SEQ ID NO:61; A2 = SEQ ID NO:63. Las bases en minúscula indican bases no de la línea germinal resultantes de o bien mutación y/o adición de N durante la recombinación. Los puntos representan huecos artificiales en la secuencia para el apropiado alineamiento de la región estructural (FR) y regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que están indicados encima de las secuencias. Se muestran para cada clon los siete primeros aminoácidos de la región bisagra de 13 aminoácidos de la región constante (BISAGRA) de IgG1 endógena.

Sumario

Se desvelan células genéticamente modificadas, embriones no humanos, animales no humanos y métodos y composiciones para producir y usarlos, en los que los animales se modifican genéticamente para carecer de una secuencia de CH1 funcional en una inmunoglobulina G (IgG), opcionalmente modificada para carecer de una región bisagra de IgG funcional en la IgG modificada, y en la que las células, embriones y animales comprenden una secuencia de CH1 de IgM funcional.

Por tanto, se proporciona un ratón transgénico que comprende una modificación de la línea germinal, modificación que comprende: (a) una delección de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio CH1 de un gen de la región constante de IgG endógena; y (b) una inclusión de uno o más segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada humana, en el que el uno o más segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada humana están operativamente enlazados a la región constante de IgG endógena de (a); en el que el ratón comprende un gen de la región constante de IgM intacta, en el que el ratón expresa un anticuerpo de cadena pesada de IgG que comprende un dominio variable humano, que carece de un dominio CH1 funcional y que carece de una cadena ligera relacionada, y en el que el ratón secreta dicho anticuerpo de cadena pesada de IgG en su suero.

En algunos aspectos, los ratones comprenden una sustitución de uno o más, o todos, de los segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón endógena con uno o más segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada humana de inmunoglobulina. En algunos aspectos, todos los segmentos de los genes V, D y J de ratón endógeno se sustituyen con uno o más segmentos del gen V humano, uno o más de D humano y uno o más de J humano.

El ratón genéticamente modificado proporcionado es uno en el que la modificación genética comprende una modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica una región constante de IgG, en el que la modificación produce una pérdida de función del dominio CH1 de la región constante de IgG. En una realización, la modificación de pérdida de función es una delección de una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio CH1, o una delección dentro de la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio CH1.

En una realización, la IgG está seleccionada de IgG1, IgG2a, IgG2b, y una combinación de las mismas. En una realización, la IgG es una IgG1. En una realización, la IgG es una IgG1, una IgG2a y una IgG2b.

En una realización, la modificación comprende además una delección de una secuencia de nucleótidos para una región bisagra de la IgG que comprende la modificación de CH1.

En una realización, el ratón genéticamente modificado está seleccionado de una cepa 129, una cepa C57BL/6 y una mezcla de 129 x C57BL/6. En una realización específica, el ratón es 50 % de 129 y 50 % de C57BL/6.

En una realización, el ratón genéticamente modificado es una cepa 129 seleccionada del grupo que consiste en 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (véase, por ejemplo, Festing et al. (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836). En una realización, el ratón genéticamente modificado es una cepa C57BL, en una realización específica seleccionada de C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, C57BL/Ola.

En una realización específica, el ratón genéticamente modificado es una mezcla de una cepa 129 anteriormente mencionada y una cepa C57BL/6 anteriormente mencionada. En otra realización específica, el ratón es una mezcla de las cepas 129 anteriormente mencionadas, o una mezcla de las cepas BL/6 anteriormente mencionadas. En una realización específica, la cepa 129 de la mezcla es una cepa 129S6 (129/SvEvTac).

También se refiere a un ratón que comprende uno o más segmentos de genes de la región variable de inmunoglobulina (mVR) de la cadena pesada de ratón sin reordenar operativamente enlazados a una secuencia de la región constante de IgG modificada. En un caso, el uno o más segmentos de genes de mVR son de una familia de genes de VH de ratón seleccionados de VH1, VH3, VH5, VH7, VH14, y una combinación de los mismos. En un caso, el uno o más segmentos de genes de mVR están seleccionados de un mVH 1-26, 1-42, 1-50, 1-58, 1-72, 3-6, 5-6, 7-1, 14-2, y una combinación de los mismos.

En una realización, el ratón comprende un gen reordenado que codifica una FR1, FR2 y una FR3 en una cadena pesada de IgG que carece de una región CH1 funcional, en la que FR1, FR2 y FR3 son cada uno independientemente al menos el 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idénticos a una FR1, FR2 y FR3 derivada de una secuencia de la línea germinal de mVH seleccionada de una familia de genes de VH1, VH3, VH5, VH7 y VH14. En una realización, la secuencia de la línea germinal de mVH está seleccionada de una secuencia 1-26, 1-42, 1-50, 1-58, 1-72, 3-6, 5-6, 7-1 y 14-2.

En una realización, el ratón comprende una CDR3 derivada de un segmento de gen de DH seleccionado de DH 1-1, 2-14, 3-1, 3-2, 3-3, 4-1, y una combinación de los mismos. En una realización, la CDR3 de ratón comprende una secuencia codificada por una JH que es una JH1, JH2, JH3 o JH4.

En una realización, el ratón comprende una secuencia de anticuerpos reordenada que codifica una CDR3 que se deriva de un reordenamiento de DH 1-1, 2-14, 3-1, 3-2, 3-3, 4-1, y una JH1, JH2, JH3 o JH4.

En una realización, el ratón comprende un gen reordenado que codifica una FR4 en una cadena pesada de IgG que carece de una región CH1 funcional, en la que FR4 es al menos el 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a una FR4 codificada por un reordenamiento de una DH1-1, 2-14, 3-1, 3-2, 3-3 o 4-1 con una JH1, JH2, JH3, o JH4.

En una realización, el ratón comprende un segmento de gen de la región variable de inmunoglobulina de la cadena pesada humana (hVR) no reordenada en un locus de la región variable de la cadena pesada de ratón endógena. El segmento de gen de hVR no reordenado está operativamente enlazado a la secuencia de la región constante de IgG modificada en un locus de la región variable de la cadena pesada de ratón endógena. En una realización, los segmentos del gen de hVR son de una familia de genes de VH humanos seleccionados de VH1, VH3, VH4, y una combinación de los mismos. En una realización, el uno o más segmentos de genes de hVR están seleccionados de 1-2, 1-8, 1-18, 1-46, 1-69, 3-21, 3-72 y 4-59. En una realización específica, el uno o más segmentos de genes de hVR están seleccionados de 1-8, 1-18 y 1-69.

En una realización, todos o sustancialmente todos los segmentos del gen V de la cadena pesada de ratón están sustituidos con el uno o más segmentos del gen V de la cadena pesada humana. En una realización, todos los segmentos de los genes V y D de la cadena pesada de ratón están sustituidos con el uno o más segmentos de los genes V y D de la cadena pesada humana. En una realización, todos los segmentos de los genes V, D y J de la cadena pesada de ratón se sustituyen con el uno o más segmentos del gen V de la cadena pesada humana, uno o más D de la cadena pesada humana y uno o más J de la cadena pesada humana. En estas realizaciones, los segmentos de los genes V y/o D y/o J de la cadena pesada humana están en el locus de la cadena pesada endógena de ratón y están operativamente enlazados al (a los) gen(es) de la región constante de ratón modificada.

En una realización, el ratón comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de FR1, FR2 y FR3 de una cadena pesada de IgG que carece de una región CH1 funcional, que es al menos el 80 % idéntica a una FR1, FR2 y FR3 de una secuencia de nucleótidos de la línea germinal humana de un segmento de gen de la región variable de la cadena pesada humana de la inmunoglobulina 1-8, 1-18, o 1-69; en el que la secuencia de FR1 + FR2 + FR3 del ratón modificado está óptimamente alineada con la secuencia de la línea germinal humana citada sin consideración de la secuencia de las CDR de las secuencias de ratón y humanas (es decir, que alinean óptimamente las FR mientras que no se consideran las identidades de aminoácidos de ninguna CDR en la comparación). En realizaciones específicas, las FR1, FR2 y FR3 son aproximadamente el 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idénticas a una secuencia de nucleótidos de la línea germinal humana de FR1 + FR2 + FR3

de un segmento de gen de la región variable de la cadena pesada que es un segmento de gen 1-8, 1-18 o 1-69.

En una realización, el ratón comprende además una FR4 que es al menos el 80 % idéntica a una FR4 formada por un reordenamiento D6-19/J6 humana, un reordenamiento D6-7/J4, un reordenamiento D4-4/J4, un reordenamiento D6-6/J2, un reordenamiento D3-16/J6, un reordenamiento D6-6/J4 y un reordenamiento D1-7/J4. En realizaciones específicas, la FR4 es aproximadamente el 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a una FR4 formada por el reordenamiento D/J anteriormente mencionada.

En una realización, el ratón comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una FR1 cuya secuencia de aminoácidos se diferencia no más de 1, no más de 2, no más de 3, no más de 4 o no más de 5 aminoácidos de una FR1 codificada por una secuencia de la línea germinal del segmento de gen de la región variable de la cadena pesada humana seleccionado de V1-8, V1-18 y V1-69. En una realización específica, la secuencia de nucleótidos que codifica la FR1 es una secuencia reordenada operativamente enlazada a una secuencia que codifica una región constante de IgG que carece de una secuencia de CH1 funcional.

En una realización, el ratón comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una FR2 cuya secuencia de aminoácidos se diferencia en no más de 1, no más de 2, no más de 3, no más de 4 o no más de 5 aminoácidos de una FR2 codificada por una secuencia de la línea germinal del segmento de gen de la región variable de la cadena pesada humana seleccionado de V1-8, V1-18 y V1-69. En una realización específica, la secuencia de nucleótidos que codifica la FR2 es una secuencia reordenada operativamente enlazada a una secuencia que codifica una región constante de IgG que carece de una secuencia de CH1 funcional.

En una realización, el ratón comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una FR3 cuya secuencia de aminoácidos se diferencia en no más de 1, no más de 2, no más de 3, no más de 4, no más de 5, no más de 6, no más de 7, no más de 8, no más de 9, no más de 10 o no más de 11 aminoácidos de una FR3 codificada por una secuencia de la línea germinal del segmento de gen de la región variable de la cadena pesada humana seleccionado de V1-8, V1-18 y V1-69. En una realización específica, la secuencia de nucleótidos que codifica la FR3 es una secuencia reordenada operativamente enlazada a una secuencia que codifica una región constante de IgG que carece de una secuencia de CH1 funcional.

En una realización, el ratón comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una FR4 cuya secuencia de aminoácidos se diferencia en no más de 1, no más de 2 o no más de 3 aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de FR4 codificada por un reordenamiento de una D6-19/J6 humana, una D6-7/J4, una D4-4/J4, una D6-6/J2, una D3-16/J6, una D6-6/J4 y una D1-7/J4. En una realización específica, la secuencia de nucleótidos que codifica la FR4 es una secuencia reordenada operativamente enlazada a una secuencia que codifica una región constante de IgG que carece de una secuencia de CH1 funcional.

En una realización, el ratón comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de CDR3 derivada de un segmento de gen de la región D de la cadena pesada humana (hDH). En una realización, hDH está seleccionado de D1-7, D3-16, D4-4, D6-6, D6-7 y D6-19.

En una realización, el ratón comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de CDR3 derivada de un segmento de gen que une las cadenas pesadas humanas (JH). En una realización específica, JH está seleccionado de J2, J4 y J6.

En una realización, el ratón comprende una CDR3 de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos derivada de un reordenamiento de DH humana y de JH humana. En una realización específica, la CDR3 se deriva de un reordenamiento D1-7/J4, D3-16/J6, D4-4/J4, D6-6/J2, D6-6/J4, D6-7/J4 o D6-19/J6.

En una realización, el ratón comprende una sustitución de un segmento de gen de mVR endógeno con un segmento de gen de hVR. La sustitución del segmento de gen de mVR con el segmento de gen de hVR está en el mismo alelo que la región constante de la cadena pesada modificada.

En una realización, el 90-100 % de los segmentos de genes de mVR se sustituyen por al menos un segmento de gen de hVR. En una realización específica, todos o sustancialmente todos de los segmentos de genes de mVR endógenos se sustituyen por al menos un segmento de gen de hVR. En una realización, la sustitución es con al menos 18, al menos 39, o al menos 80 o 81 segmentos de genes de hVR. En una realización, la sustitución es con al menos 12 segmentos de genes de hVR funcionales, al menos 25 segmentos de genes de hVR funcionales, o al menos 43 segmentos de genes de hVR funcionales.

También se refiere a un ratón genéticamente modificado que comprende un transgén que comprende al menos un segmento de gen de hVR no reordenado, al menos un segmento de D humano no reordenado, al menos un segmento de J humano no reordenado y al menos una secuencia constante de la cadena pesada humana. En un caso, los loci de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera kappa de ratón endógena están funcionalmente silenciados. En un caso específico, el ratón es capaz de cambio en *trans* para producir un anticuerpo humano/ratón quimérico que comprende un dominio variable de la cadena pesada humana

contiguo con una secuencia de IgG de ratón que carece de un dominio CH1 funcional y, opcionalmente, carece de una región bisagra de la IgG que carece del dominio CH1 funcional. En un caso específico, el transgén comprende además una secuencia de IgG que carece de un dominio CH1, y opcionalmente comprende una IgM que tiene un dominio CH1 funcional. En otro caso específico, la secuencia de IgG carece de una región bisagra.

En una realización, el ratón comprende un primer alelo de la región variable de la cadena pesada y un segundo alelo de la región variable de la cadena pesada, en la que el primer alelo y el segundo alelo son ambos de la misma cepa de ratón. En una realización, el primer alelo es de una primera cepa de ratón y el segundo alelo es de una segunda cepa de ratón. En una realización, un alelo del primer y el segundo alelos comprende una sustitución de una mVR con al menos una hVR. En otra realización, ambos alelos comprenden una sustitución de una mVR con al menos una hVR.

En un aspecto, el ratón genéticamente modificado proporcionado es uno en el que el ratón expresa una IgM que comprende un dominio CH1, y el ratón expresa una IgG que carece de un dominio CH1 funcional o que expresa una IgG que carece de tanto un dominio CH1 funcional como que carece de una región bisagra funcional.

En una realización, la IgG es una IgG1.

En una realización, el ratón expresa cuatro IgG que son: una IgG1 modificada y una IgG3, IgG2a e IgG2b no mutante. En otra realización, el ratón expresa no más de dos IgG que son: una IgG1 modificada y una IgG3 no mutante. En una realización específica, el ratón expresa isotipos de la cadena pesada que son: una IgM no mutante, una IgD no mutante, una IgG3 no mutante, una IgG1 modificada, una IgG2a no mutante, una IgG2b no mutante, una IgA no mutante y una IgE no mutante. En otra realización específica, el ratón expresa isotipos de la cadena pesada que son: una IgM no mutante, una IgD no mutante, una IgG3 no mutante, una IgG1 modificada, una IgA no mutante y una IgE no mutante. En diversas realizaciones, la modificación de la IgG1 comprende una delección de un dominio CH1 y, opcionalmente, una delección de una región bisagra.

En una realización, el ratón es de una cepa seleccionada de 129, C56BL/6, una 129 x C57BL/6 mixta.

En un aspecto, el ratón expresa un anticuerpo de cadena pesada, en el que el anticuerpo de cadena pesada consiste esencialmente en una cadena pesada dimérica, en el que la cadena pesada carece de un dominio CH1 funcional o carece de tanto un dominio CH1 funcional como de una región bisagra funcional, la cadena pesada comprende un dominio variable de la cadena pesada humana que comprende una secuencia que no es idéntica a un dominio variable de la cadena pesada humana codificado por un gen de la región variable de la línea germinal y la cadena pesada comprende un dominio CH2 humano o de ratón y un dominio CH3 humano o de ratón, en el que el ratón expresa una IgM humana o de ratón no mutante.

En una realización, el ratón comprende una cadena ligera funcional del locus del gen de inmunoglobulina.

[Borrado]

En una realización, el anticuerpo de cadena pesada consiste esencialmente en una cadena pesada dimérica que carece de un dominio CH1 funcional y que carece de una región bisagra funcional, en el que la cadena pesada comprende un dominio variable humano que comprende al menos una mutación somática y comprende un dominio CH2 y un dominio CH3. En una realización específica, el dominio CH2 y el dominio CH3 están seleccionados independientemente de dominios de ratón y humanos. En una realización específica, tanto el dominio CH2 como CH3 son humanos; en otra realización, tanto el dominio CH2 como CH3 son de ratón.

También se refiere a un anticuerpo de cadena pesada, en el que el anticuerpo de cadena pesada comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable no de camélido y una región constante de la cadena pesada que carece de un dominio CH1.

En un caso, el anticuerpo de cadena pesada carece además de una región bisagra.

En un caso, el anticuerpo de cadena pesada comprende una región constante que consiste esencialmente en una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra realización, el anticuerpo de cadena pesada comprende una región constante que consiste esencialmente en un dominio CH2 y un dominio CH3.

En un caso, el dominio variable no de camélido es un dominio variable humano o de ratón somáticamente mutado de la cadena pesada obtenido de una secuencia de nucleótidos que codifica IgM o IgG de un linfocito B de un ratón o un ratón genéticamente modificado que comprende un segmento de gen de la región variable de la cadena pesada humana. En un caso específico, el ratón comprende un segmento de gen de la región variable de la cadena pesada humanizada. En otro caso, el ratón comprende una sustitución del locus del segmento de gen de la región variable de la cadena pesada de ratón endógena con al menos un segmento de gen de la región variable humana. En otro caso, el ratón comprende una sustitución del locus de la cadena pesada de ratón endógena con al menos un segmento de gen variable humano, al menos un segmento del gen D humano y al menos un segmento del gen J

humano. En un caso específico, el locus de la región variable de inmunoglobulina de ratón endógena está todo o sustancialmente todo sustituido con un locus de la región variable humana de inmunoglobulina que comprende una pluralidad de segmentos de los genes V, D y J humanos.

El dominio variable no de camélido es un dominio variable humano. En otro caso, el dominio variable no de camélido es un dominio variable humano que comprende uno o más modificaciones camelizantes. En un caso específico, la modificación camelizante está seleccionada de L11S, V37F, G44E, L45C, L45R y W47G (numeración de Kabat). En un caso específico, la modificación camelizante está seleccionada de V37F, G44E y L45C. En un caso específico, el dominio variable de la cadena pesada comprende una región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) que comprende dos cisteínas.

En un caso, el anticuerpo de cadena pesada comprende un dímero de una primera cadena pesada que comprende un primer dominio variable de la cadena pesada y una segunda cadena pesada que comprende un segundo dominio variable de la cadena pesada, en el que cada una de la primera y la segunda cadenas pesadas carecen de un dominio CH1 (o carecen de un dominio CH1 y una región bisagra). En un caso, el dominio variable humano de la primera cadena pesada del dímero se une al primer epítoto, y el dominio variable humano de la segunda cadena pesada del dímero se une al segundo epítoto, en el que el primer y el segundo epítoto no son idénticos. En un caso específico, los dominios variables de la cadena pesada de la primera y la segunda cadenas pesadas comprenden dominios variables de la cadena pesada humana y/o regiones FR de la cadena pesada humana como se describen en el presente documento.

También se proporciona una célula aislada en la que la célula comprende una modificación que comprende: (a) una delección de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio CH1 de un gen de la región constante de IgG endógena; y (b) una inclusión de uno o más segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada humana, en la que el uno o más segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada humana están operativamente enlazados a la región constante de IgG endógena de (a); en la que la célula comprende un gen de la región constante de IgM intacto, en la que la célula expresa un anticuerpo de cadena pesada de IgG que comprende un dominio variable humano, que carece de un dominio CH1 funcional y que carece de una cadena ligera relacionada, y en la que la célula secreta dicho anticuerpo de cadena pesada de IgG. También se refiere a célula no humana genéticamente modificada, en la que la modificación genética comprende una delección de un dominio CH1 de IgG y la célula expresa una IgM funcional. En un caso específico, la célula comprende un gen de IgM que comprende una secuencia que codifica un dominio CH1. Adicionalmente se proporciona una célula madre embrionaria (ES) que comprende una modificación que comprende: (a) una delección de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio CH1 de un gen de la región constante de IgG endógena; y (b) una inclusión de uno o más segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada humana, en la que el uno o más segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada humana están operativamente enlazados a la región constante de IgG endógena de (a); en la que la célula ES comprende un gen de la región constante de IgM intacta, en la que la célula ES puede dar lugar a un ratón que expresa un anticuerpo de cadena pesada de IgG que comprende un dominio variable humano, que carece de un dominio CH1 funcional y que carece de una cadena ligera relacionada, y en la que el ratón secreta dicho anticuerpo de cadena pesada de IgG en su suero.

En una realización, la célula está seleccionada de una célula ES de ratón, una célula pluripotente y una célula totipotente.

También se refiere a un embrión de ratón genéticamente modificado, en el que la modificación genética comprende una modificación como se describe en el presente documento. En una realización, la modificación genética comprende una delección de un dominio CH1 de IgG y el embrión de ratón expresa una IgM funcional. En una realización específica, el embrión de ratón comprende un gen de IgM que comprende un dominio CH1.

[Borrado]

También se refiere a un embrión de ratón que comprende una célula de donante, en el que la célula de donante está genéticamente modificada, y en el que la modificación genética es una modificación como se describe en el presente documento. En un caso, la modificación genética comprende una delección de un dominio CH1 de IgG y la célula comprende un gen de IgM que comprende un dominio CH1.

En un caso, la célula de donante es una célula ES de ratón.

También se refiere a una construcción de ADN, en la que la construcción de ADN comprende (a) un brazo de homología de ratón homólogo a una primera secuencia 5' e inmediatamente adyacente al inicio de una región CH1 de IgG; (b) un marcador o casete de selección de fármaco; y, (c) un brazo de homología homólogo a una segunda secuencia 3' e inmediatamente adyacente al extremo de una región CH1 de IgG o, alternativamente, un brazo de homología homólogo a una segunda secuencia 3' e inmediatamente adyacente al extremo de una región bisagra de IgG.

También se refiere a un método de producción de un anticuerpo que carece de un dominio CH1, que comprende: (a) inmunizar un ratón como se describe en el presente documento que carece de un dominio CH1 funcional en una IgG o carece de un dominio CH1 funcional y carece de una región bisagra funcional en la IgG, en el que el ratón expresa una IgM que comprende un dominio CH1 funcional; (b) mantener el ratón en condiciones suficientes para que el ratón produzca un anticuerpo; (c) identificar un anticuerpo producido por el ratón que carece de un dominio CH1 funcional o que carece de una región bisagra funcional; y, (d) aislar del ratón el anticuerpo, una célula que produce el anticuerpo, o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia del anticuerpo.

En una realización, el ratón comprende una cadena ligera funcional del locus del gen de inmunoglobulina.

También se refiere a un método de humanización de un anticuerpo de cadena pesada de ratón, que comprende inmunizar un ratón genéticamente modificado que produce anticuerpos de cadena pesada con un antígeno de interés, dejar que el ratón genere una respuesta inmunitaria, identificar una región VH de ratón del ratón que está codificada en un linfocito B del ratón, en el que el linfocito B se une específicamente al antígeno de interés, y humanizar la región VH.

En un caso, el ratón genéticamente modificado que produce anticuerpos de cadena pesada es un ratón como se describe en el presente documento. En un caso, el ratón comprende al menos un segmento del gen de mVR operativamente enlazado a un locus constante de la cadena pesada que comprende un gen de IgM intacto y que comprende un gen de IgG que carece de un dominio CH1 o que carece de un dominio CH1 y carece de un dominio bisagra. En un caso, el gen de IgG es un gen de IgG1. En un caso, el gen de IgG está seleccionado de IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, y una combinación de los mismos.

En un caso, el método comprende además clonar una secuencia de nucleótidos que codifica la región VH humanizada sobre una secuencia de nucleótidos de una región constante de inmunoglobulina humana.

En un caso, el segmento del gen de mVR de ratón es de una familia de genes de VH de ratón seleccionados de VH1 y VH14, y la humanización comprende sustituir una región estructural de ratón de VH1 o VH14 con una región estructural de un gen de VH1 humano. En una realización, el gen de VH1 humano está seleccionado de 1-2, 1-3, 1-8, 1-17, 1-18, 1-24, 1-45, 1-46, 1-58 y 1-69. En casos específicos, el gen de mVR es un gen 1-58 y el gen humano es un gen 1-18; el gen de mVR es un gen 1-26 y el gen humano es un gen 1-2; el gen de mVR es un gen 1-50 y el gen humano es un gen 1-46; el gen de mVR es un gen 1-17 y el gen humano es un gen 1-2; el gen de mVR es un gen 1-42 y el gen humano es un gen 1-2; el gen de mVR es un gen 14-1 y el gen humano es un gen 1-2; o el mVR es un gen 14-2 y el gen humano es un gen 1-2.

En un caso, el segmento del gen de mVR es de un gen de VH de ratón VH seleccionado de un gen VH4, VH5, VH6, VH7, VH10, VH11 y VH13, y la humanización comprende sustituir una región estructural de ratón con una región estructural de un gen de VH3 humano. En un caso, el gen de VH3 humano está seleccionado de 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-16, 3-20, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33, 3-35, 3-38, 3-43, 3-48, 3-49, 3-53, 3-64, 3-66, 3-72, 3-73 y 3-74. En un caso específico, el gen de mVR es un gen 7-1 y el gen humano es un gen 3-72; el gen de mVR es un gen 3-6 y el gen humano es un gen 4-59; el gen de mVR es un gen 5-6 y el gen humano es un gen 3-21.

En un caso, el segmento del gen de mVR es de una familia de genes de VH de ratón seleccionados de VH3 y VH12, y la humanización comprende sustituir una región estructural de ratón con una región estructural de un gen de VH4 humano. En un caso, el gen de VH4 humano está seleccionado de 4-4, 4-28, 4-31, 4-34, 4-39, 4-59 y 4-61.

En un caso, el segmento del gen de mVR es de una familia de genes de VH4 de ratón, y la humanización comprende sustituir una región estructural VH4 de ratón con una región estructural de un gen de VH6 humano. En un caso, el gen de VH6 humano es 6-1.

En un caso, el segmento del gen de mVR es de una familia de genes de VH9 de ratón, y la humanización comprende sustituir una región estructural VH9 de ratón con una región estructural de un gen de VH humano de la familia de VH7 humana. En un caso, el gen de VH humano está seleccionado de 7-4-1 y 7-81.

En un caso, la humanización comprende además producir una o más sustituciones conservativas o no conservativas, una o más delecciones, y/o una o más inserciones en una CDR de ratón de forma que la CDR de ratón se corresponda más estrechamente con una CDR humana.

En un caso, la humanización comprende además producir una o más sustituciones conservativas o no conservativas, una o más delecciones, y/o una o más inserciones en una región estructural humana de forma que la región estructural humana se corresponda más estrechamente con la región estructural de ratón.

En un aspecto, el ratón genéticamente modificado proporcionado es uno que comprende una cadena ligera funcional del gen de inmunoglobulina, en el que el ratón expresa un anticuerpo de cadena pesada que carece de una cadena ligera y que carece de una región CH1 o que carece de una región CH1 y una región bisagra.

- El ratón comprende un gen de inmunoglobulina que carece de una secuencia que codifica una región CH1, o carece de una secuencia que codifica una región bisagra y una CH1. El gen de inmunoglobulina que carece de la secuencia es uno o más genes constantes de la cadena pesada. En una realización específica, el gen de inmunoglobulina que carece de la secuencia está seleccionado de un gen de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. El ratón comprende un gen constante de la región de IgM intacto.
- En una realización, el anticuerpo se expresa en respuesta a un antígeno, y el anticuerpo se une específicamente al antígeno.
- En una realización, el anticuerpo comprende un dominio VH de ratón. En una realización específica, el dominio VH de ratón comprende un segmento del gen de VH de ratón seleccionado de 1-26, 1-42, 1-50, 1-58, 1-72, 3-6, 5-6, 7-1, 14-1 y 14-2.
- En una realización, el anticuerpo comprende un dominio VH humano. En una realización específica, el dominio VH humano comprende una secuencia derivada de un segmento del gen de VH humano seleccionado de 1-2, 1-18, 1-46, 3-21, 3-72 y 4-59.
- En un aspecto, el ratón genéticamente modificado proporcionado expresa una proteína de unión que consiste esencialmente en dos cadenas pesadas de IgG1 que carecen cada una de un dominio CH1, en el que el ratón expresa una IgM que comprende una región CH1, y en el que el ratón es incapaz de expresar a partir de su genoma un ARNm que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio CH1 de una IgG1.
- En una realización, las cadenas pesadas de la inmunoglobulina que carecen cada una de un dominio CH1 consisten esencialmente en, del extremo N al extremo C, una región variable de inmunoglobulina de la cadena pesada humana, opcionalmente una región bisagra, una región CH2 de ratón y una región CH3 de ratón. En una realización específica, la región variable de inmunoglobulina de la cadena pesada es una región variable humana, una región bisagra está presente, y el ratón comprende un locus del gen de la cadena ligera de la inmunoglobulina funcional.
- En un aspecto, el ratón proporcionado expresa un anticuerpo de cadena pesada que carece de una cadena ligera y que carece de una región CH1 por completo o en parte, en el que el ratón expresa un receptor de linfocitos B sobre un linfocito B, en el que el receptor de linfocitos B sobre su superficie muestra una molécula de unión que comprende un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina fusionado directamente con una región bisagra de inmunoglobulina o fusionado directamente con una región CH2, en el que la molécula de unión carece de una región CH1. En una realización, la molécula de unión comprende una región CH2 y CH3 de IgG1.
- También se refiere a un método de producción de un anticuerpo de cadena pesada, que comprende inmunizar un ratón con un antígeno de interés, en el que el ratón comprende un gen de IgG que carece de una secuencia que codifica una región CH1, en el que el ratón comprende un gen de la región constante de IgM intacto, que permite que el ratón genere una respuesta inmunitaria contra el antígeno de interés, y aislar del ratón una célula o proteína que reconoce específicamente el antígeno de interés, en el que la célula o proteína comprende un anticuerpo de cadena pesada que carece de un dominio CH1 y que carece de una cadena ligera relacionada y que se une específicamente al antígeno de interés.
- En una realización, el ratón comprende un gen de la cadena ligera funcional. En una realización, el ratón comprende un gen de la cadena ligera funcional seleccionado de lambda, kappa, y una combinación de los mismos.
- En una realización, el ratón comprende una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos de V, D, J de la cadena pesada de ratón con uno o más segmentos del gen V, D, J humano.
- En una realización, el gen de IgG que carece de la secuencia que codifica una CH1 está seleccionado de una IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, y una combinación de las mismas.
- En una realización, el gen de IgG que carece de la secuencia de CH1 es IgG1, y el ratón carece de un gen que codifica IgG2a, IgG2b, IgG3, o una combinación de las mismas. En una realización, el gen de IgG que carece de la secuencia de CH1 es IgG2a, y el ratón carece de un gen que codifica IgG1, IgG2b, IgG3, o una combinación de las mismas. En una realización, el gen de IgG que carece de la secuencia de CH1 es IgG2b, y el ratón carece de un gen que codifica IgG1, IgG2a, IgG3, o una combinación de las mismas. En una realización, el gen de IgG que carece de la secuencia de CH1 es IgG3, y el ratón carece de un gen que codifica IgG1, IgG2a, IgG2b, o una combinación de las mismas.
- En una realización, el ratón comprende un linfocito B que lleva sobre su superficie un receptor de linfocitos B, en el que el receptor de linfocitos B comprende una cadena pesada de VDJ reordenada que se une al antígeno de interés, y en el que el receptor de linfocitos B comprende una IgM que comprende una región CH1, y en el que la IgM comprende una cadena ligera. En una realización, la cadena ligera es VJ reordenado. En una realización específica, la cadena ligera es una cadena ligera kappa o lambda que está relacionada con la cadena pesada reordenada de VDJ que se une el antígeno de interés.

También se refiere a anticuerpo de cadena pesada de ratón, anticuerpo de cadena pesada humana o anticuerpo de cadena pesada humano/ratón quimérico producido en un ratón según la invención.

También se refiere a anticuerpo de cadena pesada de ratón, anticuerpo de cadena pesada humano, anticuerpo de cadena pesada humano/ratón quimérico, o anticuerpo de cadena pesada humanizado producido usando una secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada o se proporciona fragmento de la misma producido en un ratón según la invención.

Otras realizaciones se describen y serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de una revisión de la descripción detallada resultante.

Descripción detallada

La invención no se limita a métodos particulares, y condiciones experimentales descritas, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones particulares solo, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solo por las reivindicaciones.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por aquellos expertos habituales en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen métodos y materiales particulares.

Dominios CH1 y producción de anticuerpos

Se proporcionan ratones genéticamente modificados que producen anticuerpos que carecen de un dominio CH1, que incluyen anticuerpos de cadena pesada, es decir, anticuerpos que carecen de cadenas ligeras. Los ratones genéticamente modificados comprenden una modificación genética que incluye una ausencia de un dominio de cadena pesada de la inmunoglobulina funcional (un dominio CH1), por ejemplo, un dominio CH1 de IgG1, y en algunas realizaciones otra modificación que comprende una delección de una región bisagra en la cadena pesada de la inmunoglobulina que carece del dominio CH1 funcional, en el que los ratones expresan una IgM funcional. Otras modificaciones incluyen convertir isotipos distintos de IgG1 para que sean no funcionales, por ejemplo, producir delecciones en genes, o delecciones de genes, para IgD, IgG3, IgG2a, IgG2b, IgA e IgE.

Se proporciona un ratón transgénico que comprende una modificación de la línea germinal, modificación que comprende: (a) una delección de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio CH1 de un gen de la región constante de IgG endógena; y (b) una inclusión de uno o más segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada humana, en el que el uno o más segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada humana están operativamente enlazados a la región constante de IgG endógena (a); en el que el ratón comprende un gen de la región constante de IgM intacto, en el que el ratón expresa un anticuerpo de cadena pesada de IgG que comprende un dominio variable humano, que carece de un dominio CH1 funcional y que carece de una cadena ligera relacionada, y en el que el ratón secreta dicho anticuerpo de cadena pesada de IgG en su suero. También se describen embriones no humanos genéticamente modificados, células, y construcciones de direccionamiento para producir los ratones, embriones no humanos y células.

Los esfuerzos por producir células genéticamente modificadas que puedan producir anticuerpos de cadena pesada (es decir, anticuerpos que carecen de una cadena ligera) se han centrado en imitar los anticuerpos de cadena pesada en otras especies, por ejemplo, en camélidos y ciertos peces. Este enfoque se ha usado para modificar genéticamente una célula ES de ratón para deleccionar dominios CH1 en los genes de la región constante de inmunoglobulina de IgM e IgG, y también para introducir regiones variables de la cadena pesada dentro de la célula ES que son de camélido, o camelizadas (es decir, VHH o similar a VHH). La delección de dominios CH1 de IgM e IgG se realiza supuestamente para prevenir la formación de anticuerpos naturales endógenos que compiten con la formación de anticuerpos camelizados de un locus genéticamente modificado. La adición de segmentos de genes de VHH se realiza supuestamente para imitar la formación de anticuerpos de cadena pesada en combinación con la delección de CH1. Los anticuerpos de cadena pesada de tales animales contendrán el segmento de gen de VHH. Se cree supuestamente que los segmentos de genes de VHH son necesarios para la apropiada expresión de un anticuerpo de cadena pesada, ya que estudios *in vitro* indican que los dominios VH no de camélido no forman satisfactoriamente anticuerpos de cadena pesada expresables cuando están presentes en cadenas pesadas que carecen de un dominio CH1.

En camélidos, sin embargo (y en algunos peces cartilaginosos), están presentes genes que incluyen dominios CH1, o dominios similares a CH1. Se cree que los anticuerpos que contienen VHH que carecen de dominios CH1 resultan del corte y empalme de ARN o del reordenamiento de secuencias de ADN que pueden codificar una región CH1. Así, incluso los camélidos tienen secuencias de ADN retenidas que codifican regiones CH1. Debido a que los seres humanos (bajo algunas circunstancias) pueden producir anticuerpos de cadena pesada que carecen de una región

CH1 por completo o en parte (por ejemplo, en enfermedad de la cadena pesada humana), podría ser posible forzar a los no camélidos, tales como a los ratones, a formar cadenas pesadas que carecen de una región CH1 bajo un conjunto dado de circunstancias. Este enfoque se basa en no perturbar la estructura de la línea germinal de un CH, sino en su lugar convertir el locus de la cadena ligera del animal en no funcional. Este enfoque asume que con un locus de la cadena ligera no funcional, aquellas cadenas pesadas que requieren una cadena ligera relacionada para la expresión (por ejemplo, cadenas pesadas de longitud completa que tienen regiones CH1) no se producen debido a la ausencia de cualquier cadena ligera kappa o lambda, de forma que solo aquellas cadenas pesadas que pueden expresar y secretar sin una cadena ligera (es decir, cadenas pesadas que carecen de una región CH1) se expresarán y secretarán. El enfoque se basa en la ausencia de segmentos de genes kappa o lambda funcionales que pueden reordenarse para formar un gen de la cadena ligera funcional, y en la ausencia de cualquier gen de la cadena ligera reordenada funcional, y así requiere una manipulación genética (por ejemplo, una inactivación) para destruir la funcionalidad de ambos loci de la cadena ligera de la línea germinal. El enfoque se basa en procesos "naturales" que conducen al no uso de la secuencia de nucleótidos de CH1 endógena, y que el proceso "natural" del silenciamiento de CH1 se produce en el cambio de clase. No parece haber ninguna posibilidad de uso de un proceso tal en ningún animal que contenga un gen de la cadena ligera funcional. Además, parece que el proceso "natural" incluye la síntesis de grandes cantidades de ARN normal, es decir, ARN que incluye una región que codifica una región CH1.

Composiciones y métodos se refieren a producir el ratón que produce un anticuerpo que carece de un dominio CH1 de inmunoglobulina (y opcionalmente una región bisagra), que incluye anticuerpos de cadena pesada, y que incluye anticuerpos que comprenden dominios VH (por ejemplo, dominios VH de ratón o humanos). Los métodos incluyen convertir selectivamente una región CH1 no de IgM endógena para que sea no funcional (por ejemplo, por una delección de una secuencia de un dominio CH1), y emplear segmentos de genes de la región variable humana (hVR) no reordenados en el locus de la región variable de ratón endógena para producir un anticuerpo humano/ratón quimérico en un ratón. La delección del dominio CH1 se hace en uno o más genes de IgG, pero no en un gen de IgM. El enfoque convierte selectivamente uno o más dominios CH1 de IgG en no funcionales, mientras que retiene una IgM funcional. Además de una delección del uno o más dominios CH1 de IgG, otra realización proporciona deleccionar o convertir la región bisagra no funcional de las IgG(s) en las que el dominio CH1 está deleccionado o se convierte en no funcional.

El enfoque de delección de CH1 de IgG emplea una alteración relativamente conservativa en el desarrollo de linfocitos B naturales en el animal, debido a que no todos los isotipos Ig del animal no humano genéticamente modificado presentarán un CH1 no funcional o una delección del dominio CH1 (y, opcionalmente, bisagra). Así, la modificación de CH1 no se producen en moléculas de IgM y así no afecta a aquellas etapas en el desarrollo temprano de linfocitos B que dependen de una IgM que tiene un CH1 funcional. Debido a que la IgM no está modificada, los animales que llevan una o más delecciones del dominio CH1 de una IgG (y opcionalmente una región bisagra de la IgG), pero no un dominio CH1 de una IgM, deben ser capaces de procesar un repertorio satisfactoriamente grande de regiones variables en etapas de selección clónica antes de la presentación del dominio variable en el contexto de una IgG. Así, en diversas realizaciones, cualquier efecto perjudicial de la(s) modificación (modificaciones) genética(s) sobre la diversidad de regiones variables disponibles para su uso en un anticuerpo de cadena pesada no debe afectar negativamente el conjunto de regiones variables disponibles para la selección en un contexto de IgG. Además, si la secuencia de CH1 que va a convertirse en no funcional (por ejemplo, deleccionarse) en la línea germinal es una IgG1, el ratón carecerá de la capacidad para producir cualquier ARN que codifique un dominio CH1.

El modificar genéticamente un animal no humano para convertir un dominio CH1 o un dominio CH1 y una región bisagra de uno o más isotipos IgG en no funcional puede producir un ratón que es capaz de seleccionar, de un repertorio completo o sustancialmente completo de regiones VH, una región VH adecuada para expresar en un anticuerpo de cadena pesada. El modificar selectivamente isotipos de IgG (pero no IgM) evita una posible reducción en el número de regiones VH que sobreviven a la selección debido a una ausencia de un dominio CH1 o una ausencia de un dominio CH1 en IgM. Así, está disponible un repertorio más completo de regiones VH para la selección en el contexto de una IgG (que carece de un dominio CH1 o que carece de un dominio CH1 y que carece de una región bisagra). Así, la selección de un dominio VH en un ratón genéticamente modificado según la invención no depende, por ejemplo, de qué dominio VH podría ayudar a vencer las tempranas cargas de desarrollo de linfocitos B dependientes de IgM que son debidas a estructuras de IgM modificadas. En su lugar, las etapas tempranas dependientes de IgM deben producirse como normales, produciendo un gran repertorio de cadenas pesadas disponibles para la selección en cuanto a su idoneidad para expresar en el contexto de una IgG que carece de un dominio CH1 o que carece de un dominio CH1 y carece de una región bisagra.

Así, en diversas realizaciones, un ratón genéticamente modificado según la invención debe mantener la expresión de IgM funcional, que debe proporcionar una oportunidad de un proceso de selección clónico más natural. Por ejemplo, con una IgM funcional (por ejemplo, una IgM que no carece de un dominio CH1), tanto la cadena ligera sustituta como la cadena ligera relacionada serán capaces de asociarse mediante el dominio CH1 de IgM y participar en procesos de selección en el desarrollo temprano de linfocitos B. En un ratón genéticamente modificado según la invención, se cree que el cambio de clase a un isotipo IgG es la primera etapa de selección en la que se encuentra cualquier selección de dominios variables de la cadena pesada que pueda expresarse en el contexto de

un dominio constante que carece de un dominio CH1 funcional o que carece de un dominio CH1 funcional y una bisagra funcional.

IgM en el desarrollo de linfocitos B

Aunque observaciones en camélidos, ciertos peces y en afecciones patológicas revelan que bajo algunas circunstancias un anticuerpo que carece de un dominio CH1 de su región constante de la cadena pesada puede expresarse en ausencia de una cadena ligera relacionada, el desarrollo normal de linfocitos B productores de anticuerpo generalmente requiere la presencia de un dominio CH1. Todos los isotipos de la cadena pesada, que incluyen IgM, comprenden un dominio CH1. Se cree que tanto la cadena ligera sustituta como una cadena ligera relacionada interaccionan con una cadena pesada dada mediante el dominio CH1 de la cadena pesada en el contexto de una IgM. Hasta el punto de que el desarrollo de anticuerpos de cadena pesada depende de la integridad o funcionalidad estructural de una cadena pesada de isotipo IgM, la alteración de la integridad estructural de la IgM o función no sería deseable.

El desarrollo normal de anticuerpos requiere que los anticuerpos sobrevivan a través de una multiplicidad de esquemas de selección complejos que producen la supervivencia y la definitiva expresión de anticuerpos funcionales y útiles. Las alteraciones en la estructura del anticuerpo pueden demostrar ser perjudiciales para la supervivencia y la expresión definitiva de un anticuerpo hasta el punto que la alteración estructural produzca la incapacidad del anticuerpo para competir y desarrollarse eficazmente para la satisfacción de uno o más de los esquemas de selección de anticuerpos de la naturaleza.

Pronto en el desarrollo de anticuerpos, las cadenas pesadas del anticuerpo se someten a un proceso de selección en el que la naturaleza elige, mediante una variedad de esquemas de selección, cadenas pesadas adecuadas para someterse a selección adicional para formar con el tiempo anticuerpos funcionales y madurados por afinidad. Las cadenas pesadas del anticuerpo expresadas a partir de segmentos de genes de la cadena pesada recombinados en linfocitos B progenitores (o pro-linfocitos B) normalmente se emparejan con una cadena ligera suplente para la presentación sobre la superficie del pro-linfocito B en un isotipo IgM para formar una estructura (que incluye otros co-receptores) denominados un pre-receptor de linfocitos B, o pre-BCR. Una vez el pre-BCR se presenta sobre la superficie celular, se cree que el pre-BCR señala su formación apropiada del complejo a la célula, instruyendo eficazmente a la célula de que la cadena pesada ha pasado esta etapa de selección temprana. Así, la célula es informada de que la cadena pesada puede someterse a selección adicional. Si la cadena pesada contiene un defecto que es perjudicial para la formación de un pre-BCR cuando se presenta en el contexto de una IgM y una cadena ligera suplente, la célula experimentará apoptosis. Si la célula experimenta apoptosis, se perderá la utilidad, o contribución a la diversidad, de la región variable de la cadena pesada de la cadena pesada. Así, una etapa muy temprana en la selección de anticuerpos requiere la presentación de la cadena pesada junto con una cadena ligera suplente en el contexto de un isotipo IgM. Se cree que la cadena ligera suplente interacciona con IgM al menos en parte mediante el dominio CH1 de IgM. Un fallo o alteración en la estructura del anticuerpo en esta unión temprana (por ejemplo, un dominio CH1 no funcional) puede producir un fallo de la selección clónica, pérdida del pro-linfocito B que expresa la cadena pesada, y pérdida de la posibilidad de emplear el dominio variable de la cadena pesada particular en un anticuerpo útil.

Una vez la célula que lleva el pre-BCR pasa esta etapa de selección, la siguiente etapa de selección requiere que la cadena pesada se empareje con una cadena ligera relacionada (por ejemplo, tanto kappa como lambda en ratones y seres humanos). La estructura de la cadena pesada/cadena ligera relacionada emparejadas se presenta de nuevo sobre la superficie de la célula, ahora un pre-linfocito B sin tratamiento previo, en el contexto de un isotipo de IgM mediante el dominio CH1 de IgM. Este complejo sobre la superficie produce un receptor de linfocitos B (BCR) unido a la membrana funcional. Se cree que este BCR señala a la célula que la cadena pesada es adecuada para la selección adicional, y que la célula puede ahora comprometerse para expresar esta cadena ligera particular y proceder a etapas de maduración de linfocitos B adicionales, que incluyen maduración por afinidad y cambio de clase. Si la cadena pesada contiene un defecto que es perjudicial para la formación de un BCR cuando se presenta en el contexto de una IgM y su cadena ligera relacionada, la célula experimentará apoptosis. Si la célula experimenta apoptosis, se perderá la utilidad, o contribución a la diversidad, de la región variable de la cadena pesada de la cadena pesada. Así, una etapa muy temprana en la selección de anticuerpos requiere la presentación de la cadena pesada junto con una cadena ligera suplente en el contexto de un isotipo IgM. Otra vez, un fallo o alteración en la estructura del anticuerpo (por ejemplo, un dominio CH1 no funcional) en esta unión temprana puede producir fallo de la selección clónica y pérdida concomitante del pre-linfocito B que expresa la cadena pesada.

Habiendo sobrevivido a la selección hasta ahora, el pre-linfocito B que presenta la cadena pesada emparejada con su cadena ligera relacionada en el contexto de IgM se somete entonces a un proceso de maduración que por último lugar produce el cambio de clase y mecanismos de selección adicionales en los que la cadena pesada y la cadena ligera relacionada se presentan sobre la superficie del linfocito B en el contexto de un isotipo IgG. Sería en esta etapa que se produciría cualquier selección de cadenas pesadas de IgG que carecen de un dominio CH1 o que carecen de un dominio CH1 y una región bisagra. En ratones según la invención, se cree que un repertorio normal de regiones variables de la cadena pesada estaría disponible para la selección basándose en si el dominio variable sobreviviría para expresarse en una cadena pesada de IgG que carece de un dominio CH1 o que carece de un

dominio CH1 y una región bisagra. A diferencia, los ratones que tienen IgM alteradas probablemente no presentarían un repertorio completo de regiones variables de la cadena pesada, ya que solo aquellas regiones variables capaces de sobrevivir a la selección en el contexto de una IgM alterada estarían disponibles para el cambio de clase.

- 5 Así, un animal que carece de una IgM funcional puede experimentar una reducción marcada en la capacidad para producir una población de linfocitos B tras el reordenamiento de segmentos de genes variables de la cadena pesada por lo demás adecuados. En un caso tal, incluso si está disponible un amplio suministro de regiones variables de la cadena pesada (es decir, el animal tiene un número adecuado de segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada capaces de reordenarse), puede no formarse una población satisfactoria de linfocitos B que muestre un grado de diversidad deseable debido a una alteración de IgM que mitiga contra la supervivencia de una cadena pesada durante el proceso de selección.

Producción de anticuerpos de la cadena pesada con un gen de IgM funcional

- 15 Se desea mantener un número adecuado de regiones variables de la cadena pesada reordenadas que puedan sobrevivir eficazmente a la selección cuando se presentan durante el desarrollo de linfocitos B en el contexto de una IgM con el fin de generar diversidad suficiente para producir anticuerpos inmunizando un animal no humano con un inmunógeno de interés. Así, un ratón genéticamente modificado que comprende un dominio CH1 no funcional o un dominio CH1 no funcional y una región bisagra no funcional en una cadena pesada de la inmunoglobulina no debe comprender una delección de CH1 en ambos alelos de IgM.

- 25 En algunas realizaciones, no se desea deleccionar dominios CH1 de todos los isotipos de Ig con el fin de producir un anticuerpo de cadena pesada en un ratón genéticamente modificado. Así, métodos y composiciones se refieren a producir un anticuerpo de cadena pesada en un ratón genéticamente modificado inhabilitando, deleccionando, o convirtiendo de otro modo en no funcional una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio CH1 o fragmento del mismo de una IgG (y en algunas realizaciones también inhabilitando, deleccionando o convirtiendo de otro modo en no funcional una región bisagra de la IgG) mientras que se permiten otros isotipos (por ejemplo, IgM) para retener dominios CH1 funcionales. Se cree que la funcionalidad de otros dominios CH1 de isotipo (distintos de uno o más dominios CH1 de IgG seleccionados) produce un proceso de desarrollo de linfocitos B que no altera o altera sustancialmente las etapas de desarrollo en las que el dominio variable de la cadena pesada se presenta en el contexto de un isotipo no IgG, por ejemplo, en un isotipo IgM. Así, la alteración de, por ejemplo, etapas dependientes de IgM durante el desarrollo de linfocitos B se minimiza relativamente. Sin limitación en cuanto a la invención (que se describe por las reivindicaciones), los inventores proponen que minimizar la alteración de etapas de selección tempranas asociadas a la presentación del dominio variable de la cadena pesada en un contexto de IgM producirá más células que poseen las regiones variables de la cadena pesada que sobreviven a experimentar cambio de clase a un isotipo IgG y selección en el contexto de una IgG que carece de un dominio CH1 funcional o que carece de un dominio CH1 funcional y carece de una región bisagra funcional.

- 40 Por consiguiente, se proporciona un ratón genéticamente modificado, también se refiere a métodos y composiciones de producción del ratón, en el que la modificación genética produce la ausencia de un dominio CH1 funcional (en otra realización la ausencia de una región bisagra funcional) en un dominio de Ig que no es un dominio de IgM. En diversas realizaciones, una secuencia que codifica CH1 o CH1 y la región bisagra (o una porción sustancialmente funcional de la misma) se deleciona en el genoma del ratón genéticamente modificado. El ratón genéticamente modificado es útil en producir anticuerpos de cadena pesada (es decir, anticuerpos que carecen de una cadena ligera), que incluyen anticuerpos completamente humanos (en un ratón genéticamente modificado para incluir genes de la inmunoglobulina humana) y anticuerpos humanos/ratón quiméricos (por ejemplo, en un ratón genéticamente modificado para incluir segmentos de genes de la región variable humana, regiones D y regiones J).

Anticuerpos de cadena pesada

- 50 Los anticuerpos son útiles como terapéuticos humanos. También son útiles anticuerpos de cadena pesada, es decir, anticuerpos que carecen de una cadena ligera, como terapéuticos humanos. Debido a que los anticuerpos de cadena pesada carecen de una cadena ligera, son más pequeños y así se espera que presenten mejor penetración en el tejido que los anticuerpos que contienen cadenas ligeras, incluso tienen un perfil farmacocinético similar o más favorable e incluso retienen función efectora similar en comparación con un anticuerpo convencional. Debido a que son más pequeños, los anticuerpos de cadena pesada también son capaces de administración a una mayor dosis en un volumen dado. Un método frecuente de administración de anticuerpos es mediante inyección subcutánea, y una reducción en el volumen de administración para una dosificación dada de anticuerpo puede proporcionar beneficios a pacientes y evitar complicaciones y dolor debido a inyecciones subcutáneas de grandes volúmenes.

- 60 Otra ventaja de los anticuerpos de cadena pesada es la capacidad para producir anticuerpos biespecíficos por heterodimerización de cadenas pesadas con especificidad por dos epítopes diferentes en un único terapéutico. Debido a que los anticuerpos de cadena pesada carecen de una cadena ligera, son particularmente aptos para producir anticuerpos biespecíficos, ya que no hay requisito de manipular por ingeniería una cadena ligera común que no interferiría con la afinidad de unión o especificidad de cualquier cadena pesada, sino que también permitiría la expresión adecuada del anticuerpo biespecífico.

Los ratones genéticamente modificados de la invención pueden usarse para producir una amplia variedad de anticuerpos de cadena pesada. Las modificaciones genéticas descritas en el presente documento pueden hacerse, por ejemplo, en cualquier cepa de ratón adecuada. La cepa de ratón puede tener cualquier antecedente genético adecuado para producir un anticuerpo de cadena pesada de elección. Algunos antecedentes genéticos que engloban realizaciones particulares se proporcionan a continuación.

El ratón genéticamente modificado puede ser un ratón que comprende una modificación genética según la invención y uno o más segmentos de genes de la región variable humana reordenados, uno o más segmentos de genes de la región D sin reordenar, y uno o más segmentos de genes de la región J sin reordenar que sustituyen un locus de la región variable de la cadena pesada de ratón endógena. En un ratón tal, el locus de la región variable humanizada es capaz de recombinarse para formar un gen de la región variable reordenado en la dirección 5' de las secuencias de dominio constante de ratón endógeno (en el que uno o más de los genes de la región constante de inmunoglobulina se modifica como se describe en el presente documento). El ratón sería así capaz de producir un anticuerpo de cadena pesada constante variable humano/ratón quimérico. Tras la exposición a un inmunógeno de interés, el ratón sería capaz de generar un anticuerpo de cadena pesada según la invención que se madura por afinidad y es capaz de unirse específicamente a un epítipo del inmunógeno de interés.

El ratón genéticamente modificado puede ser un ratón que comprende una región variable de ratón endógena que incluye segmentos de genes de la región variable de ratón endógena sin reordenar, segmentos de genes de la región D de ratón endógena sin reordenar y segmentos de genes de la región J de ratón endógena sin reordenar, en los que el ratón comprende una modificación genética de una región constante de la cadena pesada de ratón como se describe en el presente documento. El ratón sería así capaz de producir un anticuerpo de cadena pesada de ratón. Tras la exposición a un inmunógeno de interés, el ratón sería capaz de generar un anticuerpo de cadena pesada según la invención que se madura por afinidad y es capaz de unirse específicamente al epítipo del inmunógeno de interés.

También se refiere a un ratón genéticamente modificado que comprende un transgén humano que comprende segmentos de genes de la región variable humana sin reordenar, segmentos de genes D humanos sin reordenar y segmentos de genes J humanos sin reordenar, un gen μ y una secuencia que permite el cambio en *trans*. El ratón comprendería además una modificación de la región constante de la cadena pesada de ratón como se describe en el presente documento. El ratón sería así capaz de producir un anticuerpo de IgM completamente humano, y mediante cambio en *trans* un anticuerpo quimérico variable humano/constante de ratón, en el que el dominio constante comprende una modificación genética como se describe en el presente documento. Tras la exposición a un inmunógeno de interés, el ratón sería capaz de generar un anticuerpo de cadena pesada según la invención que se madura por afinidad y es capaz de unirse específicamente a un epítipo del inmunógeno de interés.

Expresión *in vitro* de anticuerpos de cadena pesada

Los inventores han establecido que una región variable de la cadena pesada humana o de ratón (hVR o mVR) normal puede expresarse en un sistema *in vitro* en el contexto de una IgG que carece de un dominio CH1 funcional. Los inventores expresaron una hVR a partir de un minilocus de hVR sin reordenar en un ratón con una IgM no mutante de ratón. La hVR expresada se clonó sobre una IgG2b que carece de un dominio CH1, y la hVR-IgG2b Δ CH1 resultante se expresó y se secretó por una célula CHO transfectada transitoriamente con la construcción de hVR-IgG2b Δ CH1, estableciendo eficazmente que una hVR seleccionada en un ratón que tiene una IgM no mutante puede ser expresada y secretada por una célula cuando se cambia a una IgG que carece de un dominio CH1 funcional, es decir, como un anticuerpo de cadena pesada.

Los inventores construyeron un sistema *in vitro* para expresar cadenas pesadas que carecen de dominios CH1 y que tienen hVR o VR camelizadas humanas (hVR*s) en células CHO. Las VR se obtuvieron de un ratón RAG que contuvo una sustitución del locus de cadena pesada de ratón endógena con un minilocus de la región variable de la cadena pesada humana (que tiene tres segmentos de genes de la región V humana, 6-1, 1-2 y 1-3, todos los segmentos de genes de DH humanos y todos los segmentos de genes de JH humanos). Los loci de la cadena ligera kappa y lambda de la inmunoglobulina de ratón endógena fueron intactos y funcionales.

Se produjeron construcciones de cadena pesada quimérica (hVR-mFc) y de cadena pesada camelizada (hVR*-mFc) para la expresión en células CHO, usando las secuencias de VR obtenidas del ratón que lleva el minilocus descrito anteriormente. Las cadenas pesadas quiméricas fueron el producto de recombinación V-D-J normal durante el desarrollo de linfocitos B en el ratón para formar un anticuerpo funcional que comprende una cadena pesada quimérica (hVR-mFc) y una cadena ligera de ratón. Se produjeron construcciones de hVR-mFc y hVR*-mFc, teniendo ambas un dominio CH1 y careciendo de un dominio CH1.

La transfección transitoria de las construcciones hVR-mFc y hVR*-mFc en células CHO mostró que en ausencia de un dominio CH1, las cadenas pesadas que tienen hVR y hVR* se expresaron y siguieron siendo solubles en el sobrenadante. En presencia de un dominio CH1, las cadenas pesadas que contienen tanto hVRs como hVR*s no se expresaron en el sobrenadante. Esta observación sugirió que tales anticuerpos de cadena pesada podrían producirse sin emplear dominios VHH de camélido, por ejemplo, con dominios VH humanos o de ratón, en

anticuerpos de cadena pesada que carecieron de un dominio CH1.

Anticuerpos de cadena pesada humanizados

5 Para producir una versión humanizada de un anticuerpo de cadena pesada, un animal homocigótico para la modificación se inmuniza con un antígeno y una vez se ha establecido una respuesta inmunitaria específica del animal, las células del bazo del animal inmunizado se fusionan con una célula inmortal adecuada (por ejemplo, una célula de mieloma) para producir células de hibridoma. Alternativamente, los anticuerpos pueden obtenerse directamente a partir de linfocitos B del animal inmunizado. Los sobrenadantes de las células de hibridoma (o, por ejemplo, de linfocitos B aislados) se criban para la presencia de anticuerpo por ensayo inmunoanalítico de adsorción (ELISA) y los anticuerpos específicos para el antígeno pueden seleccionarse basándose en las características deseadas.

15 Pueden aislarse ácidos nucleicos de la región variable de la cadena pesada (VH) de hibridoma y/o linfocitos B usando técnicas de biología molecular convencionales conocidas en la técnica (Sambrook, et al. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel, et al. 1995. Short Protocols in Molecular Biology, 3ª ed., Wiley & Sons). Una vez se ha determinado la secuencia de ácidos nucleicos de VH, la secuencia de aminoácidos deducida puede obtenerse y compararse con otras secuencias de VH humanas para identificar un grupo de secuencias de VH relacionadas que tienen una secuencia similar. Pueden obtenerse secuencias de VH relacionadas usando bases de datos de anticuerpos disponibles para aquellos expertos en la materia, por ejemplo, The International ImmunoGeneTics Information System® (IMGT®). Esta comparación puede realizarse por alineamiento de las secuencias realizado tanto a simple vista como, alternativamente, electrónicamente empleando un programa de alineamiento (por ejemplo, CLUSTAL). En esta comparación se identifican las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y las regiones estructurales (FR). Se determinan los residuos de CDR y FR según una definición de secuencias convencional (por ejemplo, Kabat et al. 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda Md.; Chotia y Lesk, 1987. J. Mol Biol. 196:901-917). Aquellos expertos en la materia apreciarán que ocasionalmente pueden existir discrepancias en los métodos de numeración y determinación de las regiones CDR y FR de una secuencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina. En tales casos, se prefiere la definición estructural, sin embargo, los residuos identificados por el método de definición de secuencias se consideran residuos de FR importantes para la determinación de qué residuos de la región estructural van a sustituirse basándose en una comparación de secuencias de la cadena pesada.

35 Una vez alineadas, se identifican las posiciones sustituibles en las secuencias de VH. Si la identidad de un aminoácido en una posición en la secuencia de VH aislada varía cuando se compara con las otras secuencias de VH humanas, entonces la posición se evalúa para la idoneidad de una sustitución en esa posición de la secuencia de VH aislada. Por tanto, cualquier posición en la secuencia de VH aislada que varíe con la(s) otra(s) secuencia(s) de VH relacionada(s) con la que está siendo comparada puede servir posiblemente de posición que podría estar sustituida con el aminoácido en la posición correspondiente encontrada en una o cualquiera de las otras secuencias de VH relacionadas. Las posiciones que comparten identidad con las otras secuencias de VH humanas relacionadas, es decir, aquellas que no demuestran variabilidad, se determinan por ser posiciones no sustituibles. En diversos casos, los métodos anteriores se emplean para proporcionar una secuencia de anticuerpos de la cadena pesada humana consenso.

45 Un anticuerpo de cadena pesada humanizado para los fines descritos en el presente documento es una variante de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la inmunoglobulina o fragmento de la misma que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región FR que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar o una idéntica en comparación con una secuencia de aminoácidos de FR humana, y una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar o idéntica a una secuencia de aminoácidos de CDR no humana. En general, un anticuerpo de cadena pesada humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos que se derivan de una fuente no humana. Tales restos normalmente se derivan de un dominio variable de la cadena pesada. Además, estos restos pueden tener asociados características tales como, por ejemplo, afinidad y/o especificidad, además de otra actividad biológica deseable asociada a la función de anticuerpo.

55 En diversas realizaciones, el anticuerpo de cadena pesada humanizado comprende sustancialmente todo de al menos uno, y en otras realizaciones al menos dos, dominios VH en los que todas o sustancialmente todas de las regiones CDR se corresponden con aquellas de un dominio VH no humano y todas o sustancialmente todas de las regiones de FR son aquellas de una secuencia del dominio VH humano. El anticuerpo de cadena pesada humanizado comprenderá una región constante de inmunoglobulina (Fc) única, que en una realización carece de al menos el dominio CH1, y en una realización también carece de la región bisagra de una Fc humana. En una realización, el anticuerpo de cadena pesada no comprenderá una cadena ligera y comprenderá las regiones CH2 y CH3 de una región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina G (IgG). En una realización, la región constante del anticuerpo de cadena pesada incluirá las regiones bisagra, CH2 y CH3 de la Fc de la cadena pesada de IgG. En una realización, la región constante del anticuerpo de cadena pesada incluirá una región CH1 de una IgM.

El anticuerpo de cadena pesada humanizado se seleccionará de cualquier clase de IgG, que incluye IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En diversas realizaciones, la región constante puede comprender secuencias de más de una clase de IgG, y el seleccionar regiones constantes particulares para optimizar funciones efectoras deseadas está dentro de la experiencia habitual de técnica.

En general, la FR de la cadena pesada y las CDR de la cadena pesada del anticuerpo de cadena pesada humanizado no necesitan corresponderse exactamente con las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR de la cadena pesada no humana o las FR de la cadena pesada humana pueden alterarse por sustitución, inserción o delección de al menos un residuo de manera que el residuo de CDR de la cadena pesada o de FR de la cadena pesada en un sitio dado no se corresponda con tanto la secuencia de FR de la cadena pesada humana como la secuencia de CDR de la cadena pesada no humana. Tales mutaciones, sin embargo, no serán amplias. En una realización, al menos el 75 % de los residuos del anticuerpo de cadena pesada humanizado se corresponderán con aquellos de las secuencias de FR de la cadena pesada parental y de CDR de la cadena pesada, en otra realización el 90 %, y en otra realización más del 95 %.

Los anticuerpos de cadena pesada humanizados como se desvelan en el presente documento, en una realización, se preparan por un proceso de análisis de secuencias parentales y diversas secuencias compuestas humanizadas conceptuales *in silico*, usando programas informáticos disponibles y conocidos para aquellos expertos en la técnica. Las modificaciones de secuencias para producir versiones humanizadas y/o para cambiar características tales como inmunogenicidad, afinidad, etc. se producen empleando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, documentos US 5.565.332 Hoogenboom et al.; US 5.639.641 Pedersen et al.; US 5.766.886 Studnicka et al.; US 5.859.205 Adair et al.; US 6.054.297 Carter et al.; US 6.407.213 Carter et al.; US 6.639.055 Carter et al.; US 6.849.425 Huse et al.; US 6.881.557 Foote; US 7.098.006 Gorman et al.; US 7.175.996 Watkins et al.; US 7.235.643 Nicolaidis et al.; US 7.393.648 Rother et al.; US 7.462.697 Couto et al.).

En diversos casos, las sustituciones deseadas a una secuencia de anticuerpos de la cadena pesada parental para producir una variante de un anticuerpo de cadena pesada parental son aquellas que en una realización mantienen, o en otra realización aumentan, la actividad de unión al antígeno del anticuerpo de cadena pesada parental. En general, una variante de anticuerpo de cadena pesada de un anticuerpo de cadena pesada parental tiene una afinidad de unión al antígeno que es al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos 100 % (por ejemplo, al menos el 150 %, al menos el 200 %, al menos el 500 %, al menos el 1000 %, o hasta al menos el 10.000 %) de la afinidad de unión del anticuerpo de cadena pesada parental con un antígeno particular. En algunas realizaciones, un anticuerpo de cadena pesada de variante comprenderá una única sustitución en comparación con un anticuerpo de cadena pesada parental. Sin embargo, en otros casos, varios aminoácidos, por ejemplo, hasta aproximadamente 5 o 10 o más, están sustituidos en comparación con la secuencia de anticuerpos de cadena pesada parental que se derivan de otras secuencias de la cadena pesada humana que comparten identidad en una posición dada. Las sustituciones en una realización son conservativas (es decir, un aminoácido que comparte propiedades similares con el residuo que va a sustituirse), y en otra realización no conservativas (es decir, un aminoácido que comparte diferentes propiedades con el residuo que va a sustituirse). En diversos casos, el anticuerpo de cadena pesada de variante resultante se prueba para confirmar que la afinidad de unión deseada y/o especificidad no han sido significativamente reducidas por los residuos de sustitución. En algunas realizaciones, un anticuerpo de cadena pesada de variante mejorado se produce por la sustitución de aminoácidos de una secuencia de la cadena pesada humana diferente.

Se ha demostrado que los anticuerpos de cadena pesada que existen de forma natural (por ejemplo, encontrados en camélidos) contienen restos de aminoácidos únicos en las posiciones correspondientes a la interfase entre regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras en moléculas de anticuerpo tradicionales (es decir, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras). Estos residuos de interfase son conocidos por afectar la proximidad u orientación de las dos cadenas con respecto a otra en anticuerpos tradicionales. Aunque estos anticuerpos de cadena pesada naturales son conocidos por contener la sustitución de residuos que se correlacionan con la ausencia de regiones variables de la cadena ligera, retienen los residuos en otras posiciones en la secuencia en comparación con anticuerpos tradicionales para preservar el pliegue de inmunoglobulina característico. Las sustituciones encontradas en anticuerpos de cadena pesada naturales son L11S, V37F, G44E, L45R o L45C, W47G y restos de cisteína adicionales que contribuyen a un enlace disulfuro entre la CDR1 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada. En algunos casos, los anticuerpos de cadena pesada pueden retener el residuo del anticuerpo parental en estas posiciones. En otros casos, el anticuerpo parental puede mostrar mutaciones en estas posiciones que están asociadas a los residuos en anticuerpos de cadena pesada naturales. En algunos casos, puede desearse retener el mismo residuo como se encuentra en el anticuerpo de cadena pesada parental en al menos una de estas posiciones o, en un caso, todas de estas posiciones cuando se produce un anticuerpo de cadena pesada humanizado derivado de una secuencia de VH aislada de un ratón genéticamente modificado como se describe en el presente documento. En diversos casos, un experto en la técnica entenderá que no se espera razonablemente que estos residuos de la interfase participen en las interacciones intercatenarias en anticuerpos de cadena pesada producidos por el ratón genéticamente modificado como se describe en el presente documento.

Producción de animales genéticamente modificados

Modificaciones genéticas para producir un animal que expresa un anticuerpo de cadena pesada se describen convenientemente usando el ratón como una ilustración. Un ratón genéticamente modificado según la invención puede producirse en una variedad de formas, realizaciones particulares de las cuales se tratan a continuación.

Una ilustración esquemática (no a escala) de un locus de IgG1 se proporciona en la figura 1 (arriba) para mostrar la disposición del dominio CH en el locus de IgG1. Como se ilustra, los dominios CH1, CH2 y CH3 y la región bisagra están presentes en tramos fácilmente identificables de nucleótidos aguas abajo de una región de cambio.

Un ratón genéticamente modificado que carece de una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio CH1 de una IgG1, pero que contiene una región bisagra, puede producirse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede producirse un vector de direccionamiento que sustituye el gen de IgG1 con una IgG1 truncada que carece de un dominio CH1, pero que contiene la bisagra. La Figura 2 ilustra un genoma de ratón (arriba) elegido como diana por una construcción de direccionamiento que tiene un brazo de homología en 5' (con respecto a la dirección de transcripción del gen de IgG1 genómico) que contiene la secuencia en la dirección 5' del dominio CH1 endógeno, seguido de secuencias de nucleótidos que codifican una bisagra de IgG1, un dominio CH2 de IgG1, un dominio CH3 de IgG1, un casete de selección de fármacos (por ejemplo, un gen de resistencia flanqueado por lox) y un dominio transmembranario de IgG1, y un brazo de homología de 3' que contiene la secuencia 3' con respecto al dominio transmembranario. Tras la recombinación homóloga en el locus y la eliminación del casete de selección de fármaco (por ejemplo, por tratamiento con Cre), la IgG1 endógena se sustituye por una IgG1 que carece de un dominio CH1 (debajo de la Figura 2; sitio lox no mostrado). La Figura 1 (IgG1ΔCH1, centro) muestra la estructura del locus resultante, que expresará una IgG1 que tiene una secuencia de la región J fusionada con una secuencia bisagra.

Puede producirse un ratón genéticamente modificado que carece de una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio CH1 de una IgG1 y que carece de una secuencia de nucleótidos que codifica una región bisagra por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede producirse un vector de direccionamiento que sustituye el gen de IgG1 con una IgG1 truncada que carece de una secuencia que codifica un dominio CH1 y que carece de una secuencia que codifica la región bisagra. La Figura 3 ilustra un genoma de ratón (arriba) elegido como diana por una construcción de direccionamiento que tiene un brazo de homología de 5' (con respecto a la dirección de transcripción del gen de IgG1 genómico) que contiene secuencia en la dirección 5' del dominio CH1 endógeno, seguido de secuencias de nucleótidos que codifican un dominio CH2 de IgG1, un dominio CH3 de IgG1, un casete de selección de fármacos (por ejemplo, un gen de resistencia flanqueado por lox) y un dominio transmembranario de IgG1, y un brazo de homología de 3' que contiene la secuencia 3' con respecto al dominio transmembranario. Tras la recombinación homóloga en el locus y la eliminación del casete de selección de fármacos (por ejemplo, por tratamiento con Cre), el gen de IgG1 endógeno está sustituido por un gen de IgG1 que carece de una secuencia que codifica un dominio CH1 (debajo de la Figura 3; sitio lox no mostrado). La Figura 1 (IgG1ΔCH1-Δbisagra, abajo) muestra la estructura del locus resultante, que expresará una IgG1 que tiene una secuencia de la región J fusionada con el dominio CH2.

Un ratón genéticamente modificado que carece de una secuencia de CH1 de IgG1 (IgG1ΔCH1), o que carece de una secuencia de CH1 de IgG1 y que carece de una bisagra (IgG1ΔCH1-Δbisagra), puede modificarse adicionalmente para favorecer el uso del isotipo IgG1 modificada delecionando uno o varios de otros isotipos IgG, por ejemplo, delecionando o inhabilitando funcionalmente secuencias que codifican IgG2b e IgG2a. Por ejemplo, se produce una construcción de direccionamiento que tiene un brazo de homología de 5' que contiene la secuencia en la dirección 5' de la secuencia de la región bisagra endógena (o en la dirección 5' de la secuencia del dominio CH1 endógeno), secuencias que codifican los dominios CH2 y CH3 de IgG1, un casete de selección de fármaco seguido de una secuencia que codifica el dominio transmembranario de IgG1, seguido de otro casete de selección de fármaco si se desea. Tras la recombinación homóloga en el locus y la eliminación del (de los) casete(s) de selección de fármacos (por ejemplo, por tratamiento con Cre), el locus constante de la cadena pesada endógena contiene solo dos genes de IgG: una IgG3 endógena y IgG1ΔCH1 (véase la Figura 4, abajo; sitio(s) de recombinasa no mostrados; véase la Figura 6, abajo) o IgG1ΔCH1-Δbisagra (véase la Figura 5, abajo; sitio(s) de recombinasa no mostrados; véase la Figura 6, abajo).

Una IgG1 expresada en un ratón genéticamente modificado que tiene un alelo de IgG1ΔCH1-Δbisagra o de IgG1ΔCH1ΔIgG2aΔIgG2b tendrá una estructura como se muestra en el panel derecho de la Figura 10, es decir, el dominio de VH se fusionará con el dominio CH2. El panel izquierdo de la Figura 10 proporciona, para comparación, un anticuerpo de IgG1 no mutante, que muestra su dominio CH1 asociado mediante una región bisagra con el dominio CH2, y asociado por enlace disulfuro al dominio constante de la cadena ligera CL. A diferencia, el anticuerpo producido por el ratón genéticamente modificado carece de los dominios bisagra y CH1 y así carece de cualquier dominio CL.

Los ratones genéticamente modificados, como se ha descrito anteriormente, y otros, se producen introduciendo una construcción de direccionamiento adecuada dentro de una célula ES adecuada de ratón (en uno o más direccionamientos independientes), y clones positivos que comprenden un marcador o casete de selección de la

construcción de direccionamiento se identifican y cultivan. Entonces se emplean clones como células ES donantes en un embrión huésped en condiciones adecuadas para producir un ratón quimérico o un ratón completamente derivado de células ES. El marcador o casete de selección puede eliminarse opcionalmente, tanto en la etapa de célula ES como en el ratón quimérico o derivado de célula ES, por ejemplo, empleando un casete flanqueado por lox y cruzando con una cepa que contiene Cre, o por electroporación de la célula ES con un vector de expresión de Cre.

Se produjo un ratón genéticamente modificado que tiene un alelo de IgG1 Δ CH1- Δ bisagra (heterocigótico) según una realización de la invención. Se aisló suero del ratón y se transfirió en una Western (condiciones reductoras) usando un anticuerpo anti-IgG1 de ratón para detectar cadena pesada. A diferencia de un ratón no mutante, que mostró una banda correspondientes en tamaño a una cadena pesada de IgG1 no mutante, el ratón genéticamente modificado para contener el alelo de IgG1 Δ CH1- Δ bisagra también expresó una cadena pesada que reaccionó con el anticuerpo anti-IgG1 de ratón que tuvo el tamaño esperado de un anticuerpo de cadena pesada que consiste en los dominios VH, CH2 y CH3 (véase la Figura 8).

Ejemplos

Ejemplo 1: Expresión *in vitro* de anticuerpos de cadena pesada

Se produjeron construcciones de la cadena pesada quiméricas usando técnicas de biología molecular (por ejemplo, véase Maniatis et al. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory) para fusionar regiones variables humanas con una región constante de IgG2b murina (mIgG2b). El segmento del gen variable humano para cada construcción fue un segmento de gen variable humano de longitud completa que contenía ambos exones (es decir, secuencia conductora más secuencia madura), identificados a partir de una hVR de una IgM aislada de un ratón RAG sin tratamiento previo que contenía una sustitución del locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón endógena con tres segmentos de genes de hVR, todos los segmentos de genes de hDH, y todos los segmentos de genes de hJH. La cadena ligera del anticuerpo IgM fue una cadena ligera de ratón.

Se usaron dos versiones de la secuencia de mIgG2b; una con y una sin un dominio CH1. También se produjeron varias otras construcciones para servir de controles de transfección y de expresión. Se produjo una primera construcción de control usando un receptor de citocina fusionado con los dominios CH2 y CH3 de la región constante de IgG2a de ratón (mIgG2a) (Control I). Se construyeron otros dos controles fusionando una secuencia señal de ROR murina con una secuencia de IgG2a murina con y sin dominios CH1 (Control II y III, respectivamente).

También se produjeron versiones camelizadas de cada región variable humana usando técnicas de mutagénesis dirigida al sitio por PCR (por ejemplo, véase Hutchinson et al. 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. J. Biol. Chem. 253(18):6551-60). Se usaron dos conjuntos de cebadores específicos para cada región variable para crear mutaciones específicas dentro de la secuencia de la región variable humana produciendo una secuencia de la región variable humana que contenía características similares a camello. Se usaron cebadores L1 (SEQ ID NO:1) y HH1.2 mut BOT (SEQ ID NO:2) para amplificar un producto que comprende la mitad de 5' de la región variable mientras que los cebadores HH1.2 mut TOP (SEQ ID NO:3) y m18.3.1 (SEQ ID NO:4) se usaron para amplificar la mitad de 3' de la región variable. Estos productos se purificaron y se mezclaron juntos para servir de molde para una tercera reacción de PCR usando los cebadores L1 y m18.3.1. El producto de PCR de la región variable humana camelizada resultante se clonó, se purificó y se confirmó por secuenciación.

Se produjeron construcciones de cadena pesada de longitud completa (variable y constante) amplificando las regiones variables humanas (camelizadas y no camelizadas) y las regiones constantes con cebadores que contenían sitios de enzimas de restricción para permitir la posterior ligación mediante extremos cohesivos. Todas las construcciones de cadena pesada de longitud completa se clonaron en vectores de expresión, se purificaron y se confirmaron otra vez por secuenciación. La Tabla 1 expone cada construcción de la cadena pesada, sus SEQ ID NOs y una descripción corta para cada construcción.

Tabla 1		
Construcción	Descripción	SEQ ID NO (ADN/Proteína)
hVR-mFc	Región variable humana no camelizada fusionada con IgG2b de ratón	5/6
hVR*-mFc	Región variable humana camelizada fusionada con IgG2b de ratón	7/8
hVR-mFc Δ CH1	Región variable humana no camelizada fusionada con IgG2b de ratón que carece de un dominio CH1	9/10
hVR*-mFc Δ CH1	Región variable humana camelizada fusionada con IgG2b de ratón que carece de un dominio CH1	11/12

Se transfectaron transitoriamente construcciones de cadena pesada quiméricas en células de ovario de hámster chino (CHO-K1) para analizar la expresión en ausencia de cadena ligera de la inmunoglobulina. Se examinaron los sobrenadantes y lisados celulares por transferencia Western para detectar la presencia de cadena pesada usando

anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Promega) por quimioluminiscencia. Todas las construcciones de cadena pesada quiméricas se transfectaron transitoriamente seis (6) veces independientes. Una transferencia Western representativa de las transfecciones se muestra en la Figura 7.

Todas las construcciones de cadena pesada quiméricas, con y sin el dominio CH1, además de las construcciones de control, se detectaron en el lisado celular. Solo se observaron construcciones que carecían de un dominio CH1 en los sobrenadantes (Figura 7, izquierda). También se detectaron Control I y Control III (proteína Fc de ratón que carece de un dominio CH1) (Figura 7), pero no se detectó proteína Fc de ratón que contuviera un dominio CH1. Tanto las construcciones de cadena pesada no camelizadas como camelizadas que contienen un dominio CH1 no se detectaron en el sobrenadante para ninguna transfección (Figura 7, derecha). Sin embargo, se detectaron tanto las construcciones de cadena pesada humanas no camelizadas como camelizadas que carecen de un dominio CH1 en el sobrenadante para todas las transfecciones. Juntos, los resultados establecen que hVRs (normales o camelizados) que carece de un dominio CH1 pueden ser expresados y secretados por células CHO transitoriamente transfectadas en ausencia de cadena ligera de la inmunoglobulina, mientras que hVRs (normales o camelizados) que contienen un dominio CH1 podrían no ser secretados en ausencia de cadena ligera.

Ejemplo 2: Modificación de la región constante de IgG1 de la cadena pesada de ratón

A. Preparación de un vector de direccionamiento IgG1-CH1-Bisagra de ratón (Figura 3)

Se construyó una construcción de direccionamiento para introducir una delección de las regiones CH1 y bisagra del dominio constante de IgG1 de ratón para el alelo C57BL/6 de una célula ES de un ratón VELOCIMMUNE® (descrito más adelante).

La construcción de direccionamiento se produjo usando tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 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 el cromosoma artificial bacteriano (BAC) BMQ 70p08. Se modificó ADN del BAC BMQ 70p08 para delecionar las regiones CH1 y bisagra del dominio constante de IgG1 mientras que dejaban el resto del gen de IgG1 intacto (por ejemplo, exones de CH2, CH3 y transmembranarios).

Brevemente, se produjeron los brazos de homología aguas arriba y aguas abajo empleando los cebadores m102 (SEQ ID NO:13) y m104 (SEQ ID NO:14) y m100 (SEQ ID NO:15) y m99 (SEQ ID NO:16), respectivamente. Estos brazos de homología se usaron para producir un casete que delecionó las regiones CH1 y bisagra del dominio constante de IgG1 mientras que retenían las regiones CH2, CH3 y transmembranaria del dominio constante de IgG1 (véase, por ejemplo, Figura 3). La construcción de direccionamiento incluyó un gen de resistencia a higromicina flanqueado por lox situado entre los exones del dominio CH3 y transmembranarios del gen de IgG1. Genes en la dirección 5' de los exones de CH1 y de bisagra (por ejemplo, IgG3, IgD, IgM) y en la dirección 3' del exón transmembranario de IgG1 (por ejemplo, IgG2b, IgG21, IgE, IgA, etc.) no fueron modificados por la construcción de direccionamiento. El cambio para todos los dominios constantes no se modificó por la construcción de direccionamiento. La secuencia de nucleótidos a través de la delección incluyó lo siguiente, que indica una secuencia aceptora de corte y empalme que está presente en el punto de delección: TGACAGTGTA ATCATATATA CTTTTCTTG T(AG)TCCCAGA AGTATCATC (SEQ ID NO:17). La secuencia de delección comprende un aceptor de corte y empalme (AG contenida dentro del paréntesis anteriormente) con secuencias pre-CH1 5' del aceptor de corte y empalme y secuencias de exón de CH2 3' del aceptor de corte y empalme.

B. Preparación de un vector de direccionamiento IgG1-CH1 de ratón (Figura 2)

Se construyó una segunda construcción de direccionamiento para introducir una delección de CH1 del dominio constante de IgG1 de ratón para el alelo 129/SvEvTac de una célula ES de un ratón VELOCIMMUNE® (descrito más adelante) de un modo similar a como se describe en la sección A de este ejemplo.

La construcción de direccionamiento se produjo usando tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 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 el cromosoma artificial bacteriano (BAC) BMQ 70p08. Se modificó ADN del BAC BMQ 70p08 para delecionar la región CH1 del dominio constante de IgG1 mientras que dejaban el resto del gen de IgG1 intacto (por ejemplo, exones de bisagra, CH2, CH3 y transmembranarios; véase la Figura 2).

Los brazos de homología para la segunda construcción de direccionamiento fueron los mismos que aquellos para el vector de direccionamiento de CH1-Bisagra (como se ha descrito anteriormente en la sección A de este ejemplo). Estos brazos de homología se usaron para producir un casete que delecionó la región CH1 del dominio constante de IgG1 mientras que retuvo las regiones bisagra, CH2, CH3 y transmembranaria del dominio constante de IgG1 (véase, por ejemplo, la Figura 2). La construcción de direccionamiento incluyó un gen de resistencia a higromicina flanqueado por lox situado entre los exones del dominio CH3 y transmembranario del gen de IgG1. Genes en la dirección 5' del exón de CH1 (por ejemplo, IgG3, IgD, IgM) y en la dirección 3' del exón transmembranario de IgG1

(por ejemplo, IgG2b, IgG21, IgE, IgA, etc.) no fueron modificados por la construcción de direccionamiento. Las regiones de cambio para todos los dominios constantes no se modificaron por la construcción de direccionamiento. La secuencia de nucleótidos a través de la delección incluyó lo siguiente, que indica una secuencia aceptora de corte y empalme que está presente en el punto de delección: TGACAGTGTA ATCACATATA CTTTTCTTG T(AG)TGCCCAG GGATTGTGGT TGTAAGCCTT GCATATGTAC AGGTAAGTCA GTAGGCCTTT CACCCTGACC C (SEQ ID NO:64). La secuencia de delección comprende un aceptor de corte y empalme (AG contenida dentro del paréntesis anteriormente) con secuencias pre-CH1 5' del aceptor de corte y empalme y secuencias de exones de bisagra 3' del aceptor de corte y empalme.

10 Ejemplo 3: Modificación de la región constante de la cadena pesada de ratón en células ES

A. Direccionamiento de las células ES de ratón con un vector de direccionamiento IgG1-CH1-Bisagra

Se eligió una célula ES de ratón como diana con la construcción de direccionamiento descrita anteriormente (es decir, una construcción de direccionamiento que introduce una delección de las regiones CH1 y bisagra del gen de IgG1). La célula ES fue de un ratón VELOCIMMUNE® que era una mezcla 50/50 de una cepa 129 y una cepa C57BL/6, que lleva modificaciones genéticas que comprenden sustitución de la región pesada y variable de ratón de segmentos de genes de la cadena ligera con segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humana sin reordenar. La cepa 129 empleada para cruzarse con C57BL/6 es una cepa que comprende una sustitución de segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada y cadena ligera de ratón con segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada y cadena ligera humana.

Los ratones VELOCIMMUNE® heterocigóticos poseen un único conjunto de genes de la región constante de la cadena pesada de ratón endógena de la cepa 129 en un alelo y un único conjunto de genes de la región constante de la cadena pesada de ratón endógeno de la cepa C57BL/6 en el otro alelo. El alelo de la cadena pesada de 129 es contiguo a un locus de segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada que son segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada humana que han sustituido los segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada de ratón endógena (es decir, en el locus de ratón endógeno). El alelo de la cadena pesada BL/6 es contiguo a los segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada de ratón no mutante. Los ratones VELOCIMMUNE® también poseen genes de la región constante de la cadena ligera de ratón endógeno no mutante. Así, por el direccionamiento del alelo de 129 con una construcción que comprende una delección de CH1 en D, E, o A de IgG, podría producirse un anticuerpo de cadena pesada humano/ratón quimérico, mientras que por el direccionamiento del alelo C57BL/6 con una construcción similar, podría producirse un anticuerpo de cadena pesada completamente de ratón que carece de un dominio CH1 y que carece de una bisagra.

Células ES de los ratones VELOCIMMUNE® descritos anteriormente se electroporaron con el vector de direccionamiento linealizado de la sección A en el Ejemplo 2 y se seleccionaron para la presencia del gen de resistencia a higromicina.

40 B. Direccionamiento de células ES de ratón con un vector de direccionamiento IgG1-CH1

De un modo similar, una célula ES de ratón se eligió como diana con la construcción de direccionamiento de CH1 descrita en la sección B del Ejemplo 2 (véase también la Figura 2). La célula ES era de un ratón VELOCIMMUNE® que era una mezcla 50/50 de una cepa 129/SvEvTac y una cepa C57BL/6, que lleva modificaciones genéticas que comprenden la sustitución de segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada y ligera de ratón con segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humana sin reordenar. La cepa 129/SvEvTac empleada para cruzar con C57BL/6 es una cepa que comprende una sustitución de los segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada y cadena ligera de ratón con segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada y cadena ligera humana.

Los ratones VELOCIMMUNE® heterocigóticos poseen un único conjunto de genes de la región constante de la cadena pesada de ratón endógena de la cepa 129/SvEvTac en un alelo y un único conjunto de genes de la región constante de la cadena pesada de ratón endógena de la cepa C57BL/6 en el otro alelo. El alelo de la cadena pesada 129/SvEvTac es contiguo a un locus de segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada que son segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada humana que han sustituido los segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada de ratón endógena (es decir, en el locus de ratón endógeno). El alelo de la cadena pesada BL/6 es contiguo a segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada de ratón no mutante. Los ratones VELOCIMMUNE® también poseen genes de la región constante de la cadena ligera de ratón endógena no mutante. Así, por el direccionamiento del alelo 129/SvEvTac con una construcción que comprende una delección de CH1 en, D, E o A de IgG podría producirse un anticuerpo de cadena pesada humano/ratón quimérico, mientras que por el direccionamiento del alelo C57BL/6 con una construcción similar, podría producirse un anticuerpo de cadena pesada completamente de ratón que carece de un dominio CH1 y que carece de una bisagra.

Células ES de los ratones VELOCIMMUNE® descritos anteriormente se electroporaron con vector de direccionamiento linealizado, descrito en la sección B en el Ejemplo 2, y se seleccionaron para la presencia del gen de resistencia a higromicina.

Ejemplo 4: Generación de ratones que llevan una región constante de IgG1 modificada**A. Ratones que llevan una delección de IgG1-CH1-Bisagra**

5 Se usaron células ES elegidas como diana descritas anteriormente como células ES de donante y se introdujeron en un embrión de ratón de estadio de 8 células por el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 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. Se identificaron VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ES de donante) que llevan alelos de IgG1
10 C57BL/6 elegidos como diana por genotipado usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela *et al.*, arriba) que detectó la presencia de secuencias situadas en la dirección 5' y en la dirección 3' de las regiones bisagra y CH1 delecionadas.

Los ratones genotipados para la delección de CH1 y de bisagra de IgG1 (en el alelo C57BL/6, es decir, el alelo de
15 ratón) se cruzaron con la cepa de ratón delecionada en Cre (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2009/114400) con el fin de eliminar el casete de hyg flanqueado por lox en la dirección 3' del exón de CH3 de IgG1 y en la dirección 5' del exón transmembranario de IgG1, introducido por la construcción de direccionamiento (véase, por ejemplo, la Figura 3). Se genotiparon crías y una cría heterocigótica para la delección de CH1 y de bisagra de IgG1 se seleccionó para examinar la cadena pesada de IgG1 expresada a partir del alelo
20 C57BL/6 en el suero de cría.

B. Ratones que llevan una delección IgG1-CH1

De un modo similar, se usaron células ES elegidas como diana que llevan una delección de la región CH1 de IgG1
25 como células de ES de donante y se introdujeron en un embrión de ratón de estadio de 8 células por el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 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. Se identificaron VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ES de donante) que llevan alelos 129SvEv/Tac elegidos como diana por genotipado usando una modificación del
30 ensayo de alelos (Valenzuela *et al.*, arriba) que detectó la presencia de secuencias situadas en la dirección 5' y en la dirección 3' de la región CH1 delecionada.

Los ratones genotipados para la delección de CH1 de IgG1 (en el alelo 129/SvEvTac, es decir, el alelo humano) se cruzaron con la cepa de ratón delecionada en Cre (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2009/114400) con el fin de eliminar el casete de hyg flanqueado por lox en la dirección 3' del
35 exón de CH3 de IgG1 y en la dirección 5' del exón transmembranario de IgG1, introducido por la construcción de direccionamiento (véase, por ejemplo, la Figura 2). Se genotiparon crías y una cría heterocigótica para la delección de CH1 de IgG1 se seleccionó para examinar la expresión de la cadena pesada modificada de IgG1.

Ejemplo 5: Anticuerpos de cadena pesada de ratones que llevan un gen de IgG1 modificado**A. Ratones IgG1-ΔCH1-ΔBisagra**

Se sangraron una cría de ratón identificada anteriormente por contener la delección de CH1 y de bisagra, y una cría
45 no mutante, y se prepararon sueros a partir de los ratones sangrados para transferencia Western para identificar cualquier IgG expresada en los sueros usando un anticuerpo anti-mIgG1. Brevemente, se usaron 10 µl de una dilución 1:100 de sueros de ratón en SDS-PAGE reductora, y el gel se transfirió a una membrana de PVDF. La transferencia se bloqueó durante la noche con 5 % de leche desnatada en solución salina tamponada con Tris con 0,05 % de Tween-20 (TBST; Sigma), se lavó 4 veces durante 5 minutos por lavado con TBST, y luego se expuso a
50 anticuerpo primario (de cabra anti-mIgG1 conjugado con HRP, Southern Biotech) diluido 1:1.000 en 1 % de leche desnatada en TBST durante dos horas a temperatura ambiente. La transferencia se lavó 6 veces durante 5 minutos por lavado. La transferencia se desarrolló durante 5 minutos con SUPERSIGNAL™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) y a continuación se expuso a película durante 1 minuto.

El suero del VELOCIMOUSE® (50 % de BL/6 no mutante; 50 % de ΔCH1-ΔBisagra BL/6) derivado de la célula ES de donante elegido como diana reveló una mezcla de bandas: una banda de aproximadamente 57,5 kD, el tamaño
55 esperado para una IgG no mutante, y una banda a aproximadamente 45 kD, el tamaño esperado para una IgG que carece de un dominio CH1 y una bisagra (Figura 8). Los resultados están de acuerdo con VELOCIMOUSE® que expresa una cadena pesada de ratón normal del alelo BL/6 no mutante y una cadena pesada de ratón
60 ΔCH1/Δbisagra a partir de su alelo BL/6 de ΔCH1-Δbisagra. Este resultado establece que los ratones genéticamente modificados que llevan un gen de IgM funcional y un gen de IgG que carece de un dominio CH1 y un dominio bisagra son capaces de expresar anticuerpos de cadena pesada en suero.

B. Ratones IgG1-ΔCH1

De un modo similar, se sangraron crías de ratón homocigóticas para la delección de CH1, y crías no mutantes. Se prepararon plasma y suero (para cinco homocigotos; dos no mutantes) a partir de los ratones sangrados para transferencia Western para identificar cualquier IgG expresada en los sueros usando un anticuerpo anti-mIgG1 (descrito anteriormente). Las transferencias Western de suero y plasma de ratones homocigóticos para la delección de IgG1-ΔCH1 revelaron una mezcla de bandas: una banda de aproximadamente 45 kD, el tamaño esperado para una IgG1 monocatenaria que carece de un dominio CH1, y una banda a aproximadamente 75 kD, el tamaño esperado para un IgG de dímero que carece de un dominio CH1 (datos no mostrados). Los resultados están de acuerdo con VELOCIMICE® homocigótico que expresa una cadena pesada de IgG1-ΔCH1 de tanto uno como ambos loci de la cadena pesada. Este resultado establece que los ratones genéticamente modificados que llevan un gen de IgM funcional y un gen de IgG que carece de un dominio CH1 son capaces de expresar anticuerpos de cadena pesada en el compartimento de linfocitos periféricos del sistema inmunitario de animales.

Ejemplo 6: Caracterización de ratones homocigóticos para la delección de IgG1-CH1-Bisagra

Se cruzaron juntos VELOCIMICE® heterocigóticos para la delección de CH1-bisagra para obtener ratones homocigóticos para la delección. Cuatro crías de ratón se identificaron como homocigóticos para IgG1 ΔCH1-Δbisagra. Se cruzaron estos cuatro ratones y un ratón no mutante y se prepararon sueros de los ratones sangrados para transferencia Western para identificar cualquier IgG expresada en los sueros usando un anticuerpo anti-mIgG1 (como se ha descrito anteriormente). La Figura 9 muestra la película revelada a partir de la membrana de PVDF usada en este experimento. Se diluyó suero 1:5 y 1:10 y se cargaron 10 μl de cada dilución sobre el gel lado a lado para cada ratón. En la porción de arriba de las imágenes de gel, los carriles se marcan para cada ratón, además de controles de IgG1 (1) y IgG2a (2a).

El suero del ratón no mutante mostró un patrón esperado para un ratón no mutante que expresa anticuerpos normales que comprenden dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras (aproximadamente 150 kD). Los cuatro ratones (homocigóticos para ΔCH1-Δbisagra de IgG1) mostraron cada uno una mezcla de bandas: una banda de aproximadamente 150 kD, el tamaño esperado para una IgG no mutante distinta de IgG1 (por ejemplo, IgG2a, IgG2b o IgG3), y una banda a aproximadamente 45 kD, el tamaño esperado para una IgG que carece de un dominio CH1 y una bisagra (Figura 9). Estos resultados están de acuerdo con los ratones que expresan un anticuerpo de cadena pesada de IgG1 que carece de un dominio CH1 y una región bisagra y que carece de una cadena ligera. Este resultado establece adicionalmente que los ratones genéticamente modificados que llevan un gen de IgM funcional y un gen de IgG que carece de un dominio CH1 y una región bisagra son capaces de expresar anticuerpos de cadena pesada en suero.

En otro experimento, la expresión de suero de IgG se determinó a partir de ratones homocigóticos para IgG1 ΔCH1-Δbisagra usando un ensayo de ELISA. Brevemente, anticuerpos específicos para tanto mIgG1 como mIgG2b (Pharmingen) se diluyeron por separado y se recubrió 100 μl/pocillo sobre placas a 2 μg/ml en 1 x PBS (Irvine Scientific) y se incubaron a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, las placas se lavaron cuatro veces con PBS con 0,05 % de Tween-20 (PBST; Sigma). Después del cuarto lavado, las placas se bloquearon con 250 μl/pocillo de PBST con 5 % de BSA (Sigma) y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Se diluyeron sucesivamente suero y patrones (factor de dilución de 0,316) en PBST en 0,5 % de BSA hacia abajo de la placa (de arriba a abajo) a una concentración de partida de 400 ng/ml (mIgG1) o 600 ng/ml (mIgG2b). Después del bloqueo, las placas se lavaron nuevamente cuatro veces con PBST. Tras el cuarto lavado, se añadieron 100 μl de suero o patrón a las placas y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente cuatro veces con PBST. Tras los lavados, se añadieron 100 μl de un anticuerpo de detección biotinilado (10 ng/ml de anti-mIgG1 de rata o 250 ng/ml de anti-mIgG2b; Pharmingen) a las placas y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente como se ha descrito anteriormente. Tras el lavado, se añadieron a las placas 100 μl/pocillo de una dilución 1:20.000 de peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina (HRP-SA) en PBST y las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron entonces seis veces con PBST, después de lo que se añadieron 100 μl/pocillo de una dilución 1:1 de sustrato A y B (BD OPTeia™; BD Biosciences) y las placas se mantuvieron en la oscuridad. La reacción se reveló en la oscuridad y se detuvo según se deseara (aprox. 15 minutos) con ácido fosfórico 1 N. Las reacciones detenidas se leyeron en un lector de placas Wallac 1420 Work Station VICTOR™ a una longitud de onda de absorción de 450 nm (1,0 s/lectura) y los resultados se representaron en gráficos (Figura 11).

El suero de ratones no mutantes mostró niveles normales de IgG1 e IgG2b. Los ratones homocigóticos para IgG1 ΔCH1-Δbisagra fueron capaces de expresar una IgG1 que carece de un dominio CH1 y una región bisagra en la periferia (suero; lado izquierdo de la Figura 11). Además, los niveles en suero de otros isotipos IgG (por ejemplo, IgG2b) no se redujeron notablemente de los niveles no mutantes (lado derecho de la Figura 11). Este resultado establece adicionalmente que los ratones genéticamente modificados que llevan un gen de IgM funcional y un gen de IgG que carece de un dominio CH1 y una región bisagra son capaces de expresar un isotipo IgG1 modificada (es decir, que carece de un dominio CH1 y una bisagra) que puede detectarse en suero.

Ejemplo 7: Análisis de reordenamientos V-D-J en ratones modificados en IgG1**A. Ratones homocigóticos para una delección de IgG1-CH1-Bisagra**

- 5 Se analizaron ratones homocigóticos para la modificación de IgG1 Δ CH1- Δ bisagra para la recombinación V-D-J y el uso de genes de la cadena pesada por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) usando ARN aislado de esplenocitos.

10 Brevemente, se recogieron bazo y se perfundieron con 10 ml de RPMI-1640 (Sigma) con 5 % de HI-FBS en bolsas desechables estériles. Cada bolsa que contiene un único bazo se dispuso entonces en un STOMACHER™ (Seward) y se homogeneizó en un establecimiento de medio durante 30 segundos. Los bazo homogeneizados se filtraron usando un filtro de células de 0,7 μ m y a continuación se sedimentaron en una centrífuga (1000 rpm durante 10 minutos) y se lisaron glóbulos rojos (RBC) en BD PHARM LYSE™ (BD Biosciences) durante tres minutos. Se diluyeron esplenocitos con RPMI-1640 y se centrifugaron nuevamente, seguido de resuspensión en 1 ml de PBS (Irvine Scientific). Se aisló ARN de esplenocitos sedimentados usando técnicas convencionales conocidas en la técnica.

20 Se realizó RT-PCR en ARN de esplenocitos usando un conjunto de cebadores degenerados específicos para segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada (VH) de ratón (Novagen) y un cebador de CH2 de IgG1 de ratón (CGATGGGGGC AGGGAAAGCT GCAC; SEQ ID NO:40). Los productos de PCR se purificaron en gel y se clonaron en pCR2.1-TOPO TA (Invitrogen) y se secuenciaron con cebadores directo M13 (GTAAAACGAC GGCCAG; SEQ ID NO: 41) e inverso M13 (CAGGAAACAG CTATGAC; SEQ ID NO: 42) situados en la secuencia de vector en las posiciones que flanquean el sitio de clonación. Se secuenciaron diecinueve clones para determinar el uso de genes de la cadena pesada y la secuencia de la unión de la VH reordenada y la CH2 de la región constante de IgG1 (Tabla 2).

Tabla 2			
Uso de genes de la cadena pesada			
Clon	V_H	D_H	J_H
B1	1-58	3-2	2
B2	1-26	4-1	1
B3	1-50	2-14	2
B4	1-58	3-2	2
B5	14-2	4-1	4
D2	3-6	1-1	4
D5	14-1	3-3	2
D6	14-2	4-1	3
D7	3-6	1-1	4
E2	7-1	3-1	4
E3	1-50	2-14	2
E4	1-50	2-14	2
E7	1-50	2-14	2
E8	1-72	1-1	4
E10	1-42	1-1	1
F6	5-6	1-1	1
F7	5-6	1-1	1
F8	5-6	1-1	1
F10	5-6	1-1	1

30 La Figura 12 muestra el alineamiento de secuencias de los dominios de VH reordenados con la CH2 de la región constante de IgG1 para once de los diecinueve clones de RT-PCR. Las secuencias mostradas en la Figura 12 ilustran reordenamientos únicos que implican diferentes segmentos de genes V, D y J de la cadena pesada de ratón e IgG1 de ratón que carecen de regiones CH1 y de bisagra. Ratones homocigóticos para una delección de las regiones CH1 y de bisagra del gen de la región constante de IgG1 endógena fueron capaces de producir cadenas pesadas que contenían dominios VH de ratón operativamente enlazados a una región CH2-CH3 de una región constante de IgG1 de ratón que carece de regiones CH1 y bisagra y producir linfocitos B que expresaron cadenas pesadas de IgG1 de ratón que carecen de regiones CH1 y bisagra y que carecen de una cadena ligera (Figuras 8 y

9). Estos reordenamientos demuestran que los loci modificados fueron capaces de reordenar independientemente segmentos de genes de la cadena pesada de ratón en múltiples linfocitos B independientes en estos ratones para producir anticuerpos de cadena pesada que son similares a aquellos normalmente encontrados en camellos. Además, este ejemplo demuestra que la delección de las regiones CH1 y bisagra de IgG1 endógena no convirtieron el locus en inoperable o previnieron la recombinación que implica la región constante de IgG1 modificada. Estos ratones produjeron anticuerpos de cadena pesada funcionales que contienen una IgG1 que carece de CH1 y regiones bisagra como parte del repertorio endógeno sin ningún defecto detectable en el desarrollo de linfocitos B.

B. Ratones homocigóticos para una delección de IgG1-CH1

De un modo similar, se analizaron ratones homocigóticos para la modificación Δ CH1 de IgG1 para recombinación de V-D-J y uso de genes de la cadena pesada humanos por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) usando ARN aislado de esplenocitos.

Brevemente, se aislaron bazo de dos ratones homocigóticos IgG1- Δ CH1 como se ha descrito anteriormente en la sección A de este ejemplo. Se aislaron linfocitos B CD19⁺ usando clasificación magnética de células (MACS, Miltenyi Biotec) de esplenocitos reunidos. Se extrajo ARN de los linfocitos B CD19⁺ clasificados usando el minikit de ADN/ARN Qiagen ALLPREP™ (Qiagen). Se sintetizó ADNc de la primera hebra con transcriptasa inversa SUPERSRIPT™ III y cebadores Oligo (dT)20 (Invitrogen). El ADNc se usó entonces como molde para la PCR realizada con un cebador específico de bisagra de IgG1 de ratón de 3' y cebadores degenerados de 5' diseñados para unir las secuencias conductoras variables pesadas humanas (Tabla 3). Se clonaron productos de PCR en el vector pCR2.1 TOPO™ TA (Invitrogen) y se secuenciaron con cebadores directo M13 e inverso M13 (como se ha descrito anteriormente en la sección A de este ejemplo).

Tabla 3		
Cebador	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
hVHL-1	TCACCATGGA CTGSACCTGG A	43
hVHL-2	CCATGGACAC ACTTTGYTCC AC	44
hVHL-3	TCACCATGGA GTTTGGGCTG AGC	45
hVHL-4	AGAACATGAA ACAYCTGTGG TTCTT	46
hVHL-5	ATGGGGTCAA CCGCCATCCT	47
hVHL-6	ACAATGTCTG TCTCCTTCCT CAT	48
Bisagra de mIgG1 en 3'	GCAAGGCTTA CAACCACAAT C	49

Para determinar el uso de genes de la cadena pesada en ratones homocigóticos para IgG1 Δ CH1, se secuenciaron veintiocho clones de RT-PCR. Dentro de estos clones, se observaron siete reordenamientos únicos de segmentos de genes V, D y J humanos (Tabla 4).

Tabla 4			
Uso de genes de la cadena pesada			
Clon	V _H	D _H	J _H
A2	1-69	6-19	6
A5	1-69	6-7	4
A8	1-8	4-4	4
C2	1-18	6-6	2
C4	1-18	3-16	6
D9	1-18	6-6	4
H8	1-18	1-7	4

La Figura 13 muestra el alineamiento de secuencias de los dominios VH reordenados con bisagra-CH2-CH3 de la región constante de IgG1 para los siete reordenamientos mostrados en la Tabla 4. Las secuencias mostradas en la Figura 13 ilustran reordenamientos únicos que implican diferentes segmentos de genes V, D y J de la cadena pesada humana e IgG1 de ratón que carece de la región CH1. Ratones homocigóticos para una delección de la región CH1 del gen de la región constante de IgG1 endógena fueron capaces de producir cadenas pesadas que contienen dominios VH humanos operativamente enlazadas a una región bisagra-CH2-CH3 de una región constante de IgG1 de ratón que carece de CH1 y producir linfocitos B que expresaron cadenas pesadas de IgG1 de ratón que carecen de regiones CH1 y que carecen de una cadena ligera (datos no mostrados). Estos reordenamientos demuestran que tanto uno como ambos loci modificados (IgG1 Δ CH1- Δ bisagra y IgG1 Δ CH1) fueron capaces de reordenar independientemente los segmentos de genes de la cadena pesada (ratón y humano) en múltiples linfocitos

B independientes en estos ratones para producir anticuerpos de cadena pesada que son similares a aquellos normalmente encontrados en camellos. Además, este ejemplo demuestra que la delección de la CH1 de IgG1 endógena no convirtió el locus en inoperable o previno la recombinación que implica segmentos de genes V, D y J de la cadena pesada humana y la región constante de IgG1 de ratón modificada. Estos ratones produjeron anticuerpos de cadena pesada funcionales que contienen dominios V de la cadena pesada humana y una IgG1 de ratón que carece de CH1 como parte del repertorio endógeno sin ningún defecto detectable en el desarrollo de linfocitos B.

LISTADO DE SECUENCIAS

10	<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.	
	<120> RATONES QUE PRODUCEN ANTICUERPOS DE CADENA PESADA	
15	<130> 0761A-WO	
	<140> A asignar	
	<141> 10-12-2010	
20	<150> 61/285.250	
	<151> 10-12-2009	
	<160> 64	
25	<170> Fast SEQ for Windows Versión 4.0	
	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sintético	
35	<400> 1	
	tcacatgga ctggacctgg a	21
	<210> 2	
	<211> 40	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sintético	
45	<400> 2	
	cccatcaact cacactcttg tccaggggcc tgcgaaacc	40
	<210> 3	
50	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
55	<223> Sintético	
	<400> 3	
	ctggttcga caggcccctg gacaagagtg tgagttgatg	40
60	<210> 4	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	
	<223> Sintético	

ES 2 595 376 T3

	<400> 4		
	acgttccgga tgaggagacg gtgaccaggg ttc		33
5	<210> 5		
	<211> 1449		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
10	<220>		
	<223> Sintético		
	<400> 5		
	atggactgga cctggaggat cctttttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcccag 60		
	gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgagggt aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120		
	tgcaaggcctt ctggatacac cttcaccggc tactatatgc actgggtgcg acaggccctc 180		
	ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aaccctaaca gtggtggcac aaactatgca 240		
	cagaagtttc agggcagggg caccatgacc ggggacacgt ccatacagcac agcctacatg 300		
	gagctgagca ggctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aggtctctta 360		
	tattgtacta atggtgtatg ctttgactac tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc 420		
	tcaaagcttt ccaaaacaac acccccatca gtctatccac tggcccctgg gtgtggagat 480		
	acaactgggt cctccgtgac tctgggatgc ctggtcaagg gctacttccc tgagtcagtg 540		
	actgtgactt ggaactctgg atccctgtcc agcagtgtgc acaccttccc agctctcctg 600		
	cagtctggac tctacactat gagcagctca gtgactgtcc cctccagcac ttggccaagt 660		
	cagaccgtca cctgcagcgt tgctcaccga gccagcagca ccacgggtga caaaaaactt 720		
	gtccggagcg agcccagcgg gccattttca acaatcaacc cctgtcctcc atgcaaggag 780		
	tgtcacaaat gccagctcc taacctcgag ggtggaccat ccgtcttcat ctccctcca 840		
	aatatcaagg atgtactcat gatctccctg acaccgaagg tcacgtgtgt ggtgggtgat 900		
	gtgagcgagg atgaccaga cgtccagatc agctggtttg tgaacaacgt ggaagtacac 960		
	acagctcaga cacaaaccca tagagaggat tacaacagta ctatccgggt ggtcagcacc 1020		
	ctccccatcc agcaccagga ctggatgagt ggcaaggagt tcaaagtcaa ggtcaacaac 1080		
	aaagacctcc catcaccat cgagagaacc atctcaaaaa ttaaagggtc agtcagagct 1140		
	ccacaagtat acatcttgcc gccaccagca gagcagttgt ccaggaaaga tgtcagctc 1200		
	acttgccctg tctgtgggct caaccctgga gacatcagtg tggagtggac cagcaatggg 1260		
	catacagagg agaactacaa ggacacgcga ccagtcctgg actctgacgg ttcttacttc 1320		
	atatatagca agctcaatat gaaaacaagc aagtgggaga aaacagattc cttctcatgc 1380		
	aacgtgagac acgaggggtc gaaaaattac tacctgaaga agaccatctc ccggtctccg 1440		
	ggtaaatga		1449
15	<210> 6		
	<211> 482		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia Artificial		
20	<220>		
	<223> Sintético		
25	<400> 6		

ES 2 595 376 T3

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

ES 2 595 376 T3

Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	Leu	Tyr	Cys	Thr	Asn	Gly	Val	Cys	Phe
		115					120					125			
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Ser
	130					135					140				
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Cys	Gly	Asp
145					150					155					160
Thr	Thr	Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe
			165						170					175	
Pro	Glu	Ser	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Ser
			180					185					190		
Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Leu	Leu	Gln	Ser	Gly	Leu	Tyr	Thr	Met	Ser
	195					200						205			
Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Gln	Thr	Val	Thr
	210					215					220				
Cys	Ser	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Thr	Val	Asp	Lys	Lys	Leu
225					230					235					240
Val	Arg	Ser	Glu	Pro	Ser	Gly	Pro	Ile	Ser	Thr	Ile	Asn	Pro	Cys	Pro
			245						250					255	
Pro	Cys	Lys	Glu	Cys	His	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Glu	Gly	Gly
			260					265					270		
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Asn	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile
		275				280						285			
Ser	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp
	290					295					300				
Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His
305				310					315						320
Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Ile	Arg
			325					330						335	
Val	Val	Ser	Thr	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys
		340					345						350		
Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu
	355					360					365				
Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Ile	Lys	Gly	Leu	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr
	370					375					380				
Ile	Leu	Pro	Pro	Pro	Ala	Glu	Gln	Leu	Ser	Arg	Lys	Asp	Val	Ser	Leu
385				390					395						400
Thr	Cys	Leu	Val	Val	Gly	Phe	Asn	Pro	Gly	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Trp
			405						410					415	
Thr	Ser	Asn	Gly	His	Thr	Glu	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asp	Thr	Ala	Pro	Val
		420						425					430		
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Ile	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Met	Lys
	435					440						445			
Thr	Ser	Lys	Trp	Glu	Lys	Thr	Asp	Ser	Phe	Ser	Cys	Asn	Val	Arg	His
	450					455					460				
Glu	Gly	Leu	Lys	Asn	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Lys	Thr	Ile	Ser	Arg	Ser	Pro
465				470						475					480
Gly	Lys														

<210> 7

<211> 1449

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 7

ES 2 595 376 T3

```

atggactgga cctggaggat ctttttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcccag 60
gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgagggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggctctc 120
tgcaaggctt ctggatacac cttcaccggc tactatatgc actggtttcg acaggcccct 180
ggacaagagt gtgagttgat gggatggatc aaccctaaca gtggtggcac aaactatgca 240
cagaagtttc agggcagggg caccatgacc ggggacacgt ccatcagcac agcctacatg 300
gagctgagca ggctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgctgag aggctcctta 360
tattgtacta atggtgtatg ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 420
tcaaagcttt ccaaaacaac acccccatca gtctatccac tggcccctgg gtgtggagat 480
acaactgggt cctccgtgac tctgggatgc ctggtcaagg gctacttccc tgagtcagtg 540
actgtgactt ggaactctgg atccctgtcc agcagtgtgc acaccttccc agctctcctg 600
cagtctggac tctacactat gagcagctca gtgactgtcc cctccagcac ttggccaagt 660
cagaccgtca cctgcagcgt tgctcaccca gccagcagca ccacggtgga caaaaaactt 720
gtccggagcg agcccagcgg gccattttca acaatcaacc cctgtcctcc atgcaaggag 780
tgtcacaaat gccagctcc taacctcgag ggtggacat ccgtcttcat cttccctcca 840
aatatcaagg atgtactcat gatctccctg acaccaagg tcacgtgtgt ggtggtggat 900
gtgagcgagg atgaccaga cgtccagatc agctggtttg tgaacaacgt ggaagtacac 960
acagctcaga cacaaacca tagagaggat tacaacagta ctatccgggt ggtcagcacc 1020
ctcccatcc agcaccagga ctggatgagt ggcaaggagt tcaaagcaa ggtcaacaac 1080
aaagacctcc catcacccat cgagagaacc atctcaaaaa ttaaagggtc agtcagagct 1140
ccacaagtat acatcttgcc gccaccagca gagcagttgt ccaggaaaga tgtcagtctc 1200
acttgctgg tcgtgggctt caaccctgga gacatcagtg tggagtggac cagcaatggg 1260
catacagagg agaactaaa ggacaccgca ccagtcctgg actctgacgg ttcttacttc 1320
atatatagca agctcaatat gaaaacaagc aagtgggaga aaacagattc cttctcatgc 1380
aacgtgagac acgaggggtc gaaaaattac tacctgaaga agaccatctc ccggtctccg 1440
ggtaaatga 1449

```

<210> 8
 <211> 482
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 8

ES 2 595 376 T3

Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Arg	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly
1				5					10					15	
Ala	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
			20					25					30		
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
		35					40					45			
Thr	Gly	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Glu	Cys
	50					55					60				
Glu	Leu	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala
65					70					75					80
Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Gly	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	Leu	Tyr	Cys	Thr	Asn	Gly	Val	Cys	Phe
		115					120					125			
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Ser
	130					135					140				
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Cys	Gly	Asp
145					150					155					160
Thr	Thr	Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe
				165					170					175	
Pro	Glu	Ser	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Ser
			180					185					190		
Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Leu	Leu	Gln	Ser	Gly	Leu	Tyr	Thr	Met	Ser
		195					200					205			
Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Gln	Thr	Val	Thr
		210					215					220			

ES 2 595 376 T3

Cys	Ser	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Thr	Val	Asp	Lys	Lys	Leu
225					230					235					240
Val	Arg	Ser	Glu	Pro	Ser	Gly	Pro	Ile	Ser	Thr	Ile	Asn	Pro	Cys	Pro
				245					250					255	
Pro	Cys	Lys	Glu	Cys	His	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Glu	Gly	Gly
			260					265					270		
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Asn	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile
		275					280					285			
Ser	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp
	290					295					300				
Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His
305					310					315					320
Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Ile	Arg
				325					330					335	
Val	Val	Ser	Thr	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys
			340					345					350		
Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu
		355					360					365			
Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Ile	Lys	Gly	Leu	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr
	370					375					380				
Ile	Leu	Pro	Pro	Pro	Ala	Glu	Gln	Leu	Ser	Arg	Lys	Asp	Val	Ser	Leu
385					390					395					400
Thr	Cys	Leu	Val	Val	Gly	Phe	Asn	Pro	Gly	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Trp
				405					410					415	
Thr	Ser	Asn	Gly	His	Thr	Glu	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asp	Thr	Ala	Pro	Val
			420					425					430		
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Ile	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Met	Lys
		435					440					445			
Thr	Ser	Lys	Trp	Glu	Lys	Thr	Asp	Ser	Phe	Ser	Cys	Asn	Val	Arg	His
	450					455					460				
Glu	Gly	Leu	Lys	Asn	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Lys	Thr	Ile	Ser	Arg	Ser	Pro
465					470					475					480
Gly	Lys														

<210> 9

<211> 1149

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 9

ES 2 595 376 T3

```

atggactgga cctggaggat ctttttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcccag 60
gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgagggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggctctcc 120
tgcaaggctt ctggatacac cttcacccgc tactatatgc actgggtgcg acagggccct 180
ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aaccctaaca gtggtggcac aaactatgca 240
cagaagtttc agggcagggt caccatgacc ggggacacgt ccatcagcac agcctacatg 300
gagctgagca ggctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgagag aggtctcctta 360
tattgtacta atggtgtatg ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 420
tcatccggag agcccagcgg gccatttca acaatcaacc cctgtcctcc atgcaaggag 480
tgtcacaat gccagctcc taacctcgag ggtggaccat ccgtcttcat cttccctcca 540
aatatcaagg atgtactcat gatctccctg acacccaagg tcacgtgtgt ggtggtggat 600
gtgagcgagg atgaccaga cgtccagatc agctgggttg tgaacaacgt ggaagtacac 660
acagctcaga cacaaccca tagagaggat tacaacagta ctatccgggt ggtcagcacc 720
ctccccatcc agcaccagga ctggatgagt ggcaaggagt tcaaatgcaa ggtcaacaac 780
aaagacctcc catcacccat cgagagaacc atctcaaaaa ttaaagggt agtcagagct 840
ccacaagtat acatcttgcc gccaccagca gagcagttgt ccaggaaaga tgcagctctc 900
acttgctggt tcgtgggctt caaccctgga gacatcagtg tggagtggac cagcaatggg 960

catacagagg agaactacaa ggacaccgca ccagtccttg actctgacgg ttcttacttc 1020
atatatagca agctcaatat gaaaacaagc aagtgggaga aaacagattc cttctcatgc 1080
aacgtgagac acgaggggtct gaaaaattac tacctgaaga agaccatctc ccggtctccg 1140
ggtaaatga . 1149

```

5 <210> 10
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Sintético
 <400> 10

ES 2 595 376 T3

<400> 10

Met 1	Asp	Trp	Thr	Trp 5	Arg	Ile	Leu	Phe	Leu 10	Val	Ala	Ala	Ala	Thr 15	Gly
Ala	His	Ser	Gln 20	Val	Gln	Leu	Val	Gln 25	Ser	Gly	Ala	Glu	Val 30	Lys	Lys
Pro	Gly	Ala 35	Ser	Val	Lys	Val	Ser 40	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly 45	Tyr	Thr	Phe
Thr	Gly 50	Tyr	Tyr	Met	His	Trp 55	Val	Arg	Gln	Ala 60	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
Glu 65	Trp	Met	Gly	Trp 70	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser 75	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala 80
Gln	Lys	Phe	Gln 85	Gly	Arg	Val	Thr	Met 90	Thr	Gly	Asp	Thr	Ser 95	Ile	Ser
Thr	Ala	Tyr	Met 100	Glu	Leu	Ser	Arg 105	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp 110	Thr	Ala	Val
Tyr	Tyr	Cys 115	Ala	Arg	Gly	Ser 120	Leu	Tyr	Cys	Thr	Asn	Gly 125	Val	Cys	Phe
Asp	Tyr 130	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr 135	Leu	Val	Thr	Val 140	Ser	Ser	Ser	Gly	Glu
Pro 145	Ser	Gly	Pro	Ile	Ser 150	Thr	Ile	Asn	Pro	Cys 155	Pro	Pro	Cys	Lys	Glu 160
Cys	His	Lys	Cys 165	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu 170	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser 175	Val	Phe
Ile	Phe	Pro	Pro 180	Asn	Ile	Lys	Asp 185	Val	Leu	Met	Ile	Ser 190	Leu	Thr	Pro
Lys	Val	Thr 195	Cys	Val	Val	Val	Asp 200	Val	Ser	Glu	Asp 205	Asp	Pro	Asp	Val
Gln	Ile 210	Ser	Trp	Phe	Val 215	Asn	Asn	Val	Glu	Val 220	His	Thr	Ala	Gln	Thr
Gln 225	Thr	His	Arg	Glu	Asp 230	Tyr	Asn	Ser	Thr	Ile 235	Arg	Val	Val	Ser	Thr 240
Leu	Pro	Ile	Gln 245	His	Gln	Asp	Trp	Met 250	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe 255	Lys	Cys
Lys	Val	Asn 260	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro 265	Ser	Pro	Ile	Glu	Arg 270	Thr	Ile	Ser
Lys	Ile 275	Lys	Gly	Leu	Val	Arg	Ala 280	Pro	Gln	Val	Tyr	Ile 285	Leu	Pro	Pro
Pro	Ala 290	Glu	Gln	Leu	Ser 295	Arg	Lys	Asp	Val	Ser 300	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
Val 305	Gly	Phe	Asn	Pro	Gly 310	Asp	Ile	Ser	Val	Glu 315	Trp	Thr	Ser	Asn	Gly 320
His	Thr	Glu	Glu 325	Asn	Tyr	Lys	Asp 330	Thr	Ala	Pro 335	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
Gly	Ser	Tyr	Phe 340	Ile	Tyr	Ser	Lys 345	Leu	Asn	Met 350	Lys	Thr	Ser	Lys	Trp
Glu	Lys 355	Thr	Asp	Ser	Phe	Ser 360	Cys	Asn	Val	Arg 365	His	Glu	Gly	Leu	Lys
Asn	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Lys	Thr	Ile	Ser	Arg	Ser	Pro	Gly	Lys		
370				375				380							

5

<210> 11

<211> 1149

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 11

5

```

atggactgga cctggaggat ccttttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccaactcccag 60
gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgagggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120
tgcaaggctt ctggatacac cttcaccggc tactatatgc actggtttcg acaggcccct 180
ggacaagagt gtgagttgat gggatggatc aaccctaaca gtggtggcac aaactatgca 240
cagaagtttc agggcaggggt caccatgacc ggggacacgt ccatcagcac agcctacatg 300
gagctgagca ggctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgagag aggctcctta 360
tattgtacta atggtgtatg ctttgactac tggggccagg gaacctgtgt caccgtctcc 420
tcatccggag agcccagcgg gccattttca acaatcaacc cctgtcctcc atgcaaggag 480
tgtcacaaat gccagctcc taacctcgag ggtggaccat ccgtcttcat cttccctcca 540
aatatcaagg atgtactcat gatctccctg acaccaagg tcacgtgtgt ggtgggtggat 600
gtgagcgagg atgaccaga cgtccagatc agctggtttg tgaacaacgt ggaagtacac 660
acagctcaga cacaaaccca tagagaggat tacaacagta ctatccgggt ggtcagcacc 720
ctccccatcc agcaccagga ctggatgagt ggcaaggagt tcaaatgcaa ggtcaacaac 780
aaagacctcc catcacccat cgagagaacc atctcaaaaa ttaaagggt agtcagagct 840
ccacaagtat acatcttgcc gccaccagca gagcagttgt ccaggaaaga tgtcagtctc 900
acttgccctg tcgtgggctt caacctgga gacatcagtg tggagtggac cagcaatggg 960
catacagagg agaactacaa ggacaccgca ccagtccctg actctgacgg ttcttacttc 1020
atatatagca agctcaatat gaaaacaagc aagtgggaga aaacagattc cttctcatgc 1080
aacgtgagac acgaggggtct gaaaaattac tacctgaaga agaccatctc ccggtctccg 1140
ggtaaatga                                     1149

```

<210> 12

<211> 382

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Sintético

15

<400> 12

```

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1           5           10           15
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
           20           25           30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
           35           40           45
Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Cys
           50           55           60
Glu Leu Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala
65           70           75           80
Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser
           85           90           95
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
           100          105          110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Leu Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Phe
           115          120          125
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Glu
           130          135          140
Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu

```

ES 2 595 376 T3

145					150					155				160
Cys	His	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
				165					170					175
Ile	Phe	Pro	Pro	Asn	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Thr
			180					185					190	
Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp
		195					200					205		
Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln
	210					215					220			
Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Ile	Arg	Val	Val	Ser
225					230					235				240
Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys
				245					250					255
Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile
			260					265					270	Ser
Lys	Ile	Lys	Gly	Leu	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Ile	Leu	Pro
	275						280					285		Pro
Pro	Ala	Glu	Gln	Leu	Ser	Arg	Lys	Asp	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
	290					295					300			Val
Val	Gly	Phe	Asn	Pro	Gly	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Thr	Ser	Asn
305					310					315				320
His	Thr	Glu	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asp	Thr	Ala	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				325					330					335
Gly	Ser	Tyr	Phe	Ile	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Met	Lys	Thr	Ser	Lys
			340					345					350	Trp
Glu	Lys	Thr	Asp	Ser	Phe	Ser	Cys	Asn	Val	Arg	His	Glu	Gly	Leu
	355						360					365		Lys
Asn	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Lys	Thr	Ile	Ser	Arg	Ser	Pro	Gly	Lys	
	370					375					380			

<210> 13
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 13
 caacacaagt gcgatgcac

19

<210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 14
 gattagcctc catgcctact c

21

<210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 15

gatgatcatg tgggtagacc t 21

5 <210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 16
tctatgctat ctcagtgcta 20

15 <210> 17
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 17
tgacagtga atcacatata cttttcttg tagtcccaga agtatcatc 49

25 <210> 18
<211> 384
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Sintético

<400> 18

35 gaggtccagc ttcagcagtc tggagctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatg 60
tcctgcaaga cttctggata tacattcaca agctacggta taaactgggt gaagcagagg 120
cctggacagg gcctggaatg gattggatat atttatattg gaaatgggta tactgagtac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacaactg acttcagaca catcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcaatct atttccgtgc aagaggacgg 300
gtcggcccgt actactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctcagtc 360
ccagaagtat catctgtctt catc 384

40 <210> 19
<211> 128
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

45 <400> 19

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

ES 2 595 376 T3

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Arg
85 90 95
Ala Arg Gly Arg Val Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
115 120 125

<210> 20
<211> 381
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 20

gagggtccagc tgcaacagtc tggacgtgag ctgggtcaagc ctgggggcttc agtgatgata 60
tcttgtacgg cttctgggata caggttcatt gactacttca taaactggat gaagcggagc 120
catggacaga gccttgagtg gattggagat attaataccta acaatgggtgg ttctaactac 180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
atggatctcc gcagcctgac atctgaagac tctgcagtct attactgtgc aaaactggga 300
cgggactggt acttcgatgt ctggggcaca gggaccacgg tcaccgtctc ctcagtccca 360
gaagtatcat ctgtcttcac c 381

<210> 21
<211> 127
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 21

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

<210> 22
<211> 375
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 22

ES 2 595 376 T3

```
cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcctc agtgaagctg 60
tcttgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcagtgggt aaaacagagg 120
cctggacagg gccttgagtg gatcggagag attgacctt ctgatagcta tactaactac 180
aatcaaaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcagcctgac acctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagatgtagg 300
tactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcagt cccagaagta 360
tcattctgtct tcatac 375
```

<210> 23
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 23

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

<210> 24
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 24

```
gaggttcagt tgcagcagtc tggggcagag attgtgaagt caggggcctc agtcaagttg 60
tcttgcaacag cttctggctt caacatgaaa gactacttta tccactgggt gaagcagagg 120
actgaacagg gcctggagtg gattggaagg cttgatcctg aggatggtaa aactaaatat 180
gccccgaaat tccagggcaa ggccactata acagcagaca catcctccaa cacagcctac 240
ctgcacctca gcagcctgac atctgaggac actgcggtct attactgtgc tagaggggga 300
ctgggacgtg aggaatacta tgctgtggac tactgggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 360
tcttcagttcc cagaagtata atctgtcttc atc 393
```

<210> 25
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 25

ES 2 595 376 T3

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

5 <210> 26
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 26

```

gatgtacagc ttcaggagtc aggacctggc ctctgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc 60
acctgctctg tcaactggcta ctccatcacc agtgggtatt actggaactg gatccggcag 120
tttccaggaa acaaaactgga atggatgggc tacataagct acgatggtag gaataactac 180
aaccatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagtttttc 240
ctgaagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aatccatacg 300
gtagtagggg actatgttat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360
gtcccagaag tatcatctgt cttcatc                                     387
  
```

15 <210> 27
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Sintético

25 <400> 27

ES 2 595 376 T3

```

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

```

<210> 28
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 28

```

gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaggc caggggcctc agtcaagttg 60
tctgcacag cttctggctt caacattaaa gactactata tacactgggt gaagaagagg 120
cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg aggatggtga tactgagtat 180
gccccgaagt tccagggcaa ggccactatg actgcagaca catcctccaa cacagcctac 240
cttcagctca gcagcctgac atctgaggac attgccgtct attactgtac tacatctagg 300
cctttttatt ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agtcccagaa 360
gtatcatctg tcttcac 378

```

<210> 29
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 29

```

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

```

ES 2 595 376 T3

<210> 30
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Sintético

10

<400> 30
 gaggttcagc tgcagcagtc tgggacagaa cttgtgaagc caggggcctc agccaagttg 60
 tcctgcacag cttctggctt caacgttaaa gactacttta tgcactgggt gaagcagaag 120
 actgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgttcctg aggatgggtga aactaagtct 180

 gccccgaaat tccaggacag gaccactata agaacagaca catcctccaa cacatctcac 240
 ctacaactca acagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc tagacctaac 300
 ccccttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctg tagtcccaga agtatcatct 360
 gtcttcac 369

15

<210> 31
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Sintético

<400> 31

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

25

<210> 32
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> Sintético

35

<400> 32

ES 2 595 376 T3

```

gaggtgaaac tgggtggaatc tggaggagge ttgggttcagt ctggggcggtc tctgagactc 60
tcctgtgcaa cttctggggtt caccttcagt gatttctaca tggagtgggt cgcgaagct 120
ccagggaagg gactggagtg gattgctaca agtagaaaca aacttaatga ttatacacca 180
gaattcagtg catctgtgaa gggtcgattc atcgtctcca gagacacttc ccaaaccatc 240
ctctaccttc agatgaatgc cctgagacct gaggacactg ccatttatta ctgtgcaaga 300
gcctgtagtg actacgaccg ttactatgct atggactatt ggggtcaagg aacctcagtc 360
accgtctcct cagtcocaga agtatcatct gtcttcate 399

```

<210> 33
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 33

```

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

```

<210> 34
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 34

```

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcggtc agtgaagctg 60
tcctgcaagg cttctgggta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120
cctggacgag gccttgagtg gattggaagg attgatacta atagtgggtg tactaagtac 180
aatgagaagc tcaagaacaa ggccacactg actgtagaca aaccctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcgggtc attattgtgc aagagaggag 300
ataaattact acggtagtag ctacgggtgct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc 360
accgtctcct cagtcocaga agtatcatct gtcttcate 399

```

<210> 35
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

ES 2 595 376 T3

<400> 35

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

5 <210> 36
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 36

gagggtccagc	tgcagcagtc	tggacctgag	ctggtgaagc	ctggggcttc	agtgaagata	60
tcctgcaagg	cttctgggta	ctcattcact	ggctactaca	tgaactgggt	gaagcaaagt	120
cctgaaaaga	gccttgagtg	gattggagag	attaatccta	gcactggtgg	tactacctac	180
aaccagaagt	tcaaggccaa	ggccacattg	actgtagaca	aatcctccag	cacagcctac	240
atgcagctca	agagcctgac	atctgaggac	tctgcagtct	attactgtgc	aggtgggttac	300
tggtacttcg	atgtctgggg	cacagggacc	acggtcaccg	tctcctcagt	cccagaagta	360
tcattctgtct	tcatac					375

15
 20 <210> 37
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

25 <400> 37

ES 2 595 376 T3

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

<210> 38
 <211> 396
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 38

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagac ttagtggagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtagtta cacctactat 180
ccagacagtg tgaaggggcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagacatgat 300
tactacggtg gtagctacgg gtggtacttc gatgtctggg gcacaggagc cacggtcacc 360

```

gtctcctcag tcccagaagt atcatctgtc ttcate 396

<210> 39
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 39

ES 2 595 376 T3

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

<210> 40
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 40
 cgatgggggc agggaaagct gcac 24

<210> 41
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 41
 gtaaaacgac ggccag 16

<210> 42
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 42
 caggaaacag ctatgac 17

<210> 43
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> variación
 <222> (14)...(14)
 <223> s = c o g

	<220> <223> Sintético	
5	<400> 43 tcaccatgga ctgsacctgg a	21
10	<210> 44 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <221> > variación <222> (17)...(17) <223> y = c o t	
20	<220> <223> Sintético	
25	<400> 44 ccatggacac acttgytcc ac	22
30	<210> 45 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> Sintético	
40	<400> 45 tcaccatgga gttgggctg agc	23
45	<210> 46 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <221> > variación <222> (14)...(14) <223> y = c o t	
55	<220> <223> Sintético	
60	<400> 46 agaacatgaa acayctgtgg ttctt	25
65	<210> 47 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Sintético	
	<400> 47 atgggggtcaa ccgccatcct	20
	<210> 48 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	

ES 2 595 376 T3

<220>
 <223> Sintético

5 <400> 48
 acaatgtctg tctccttct cat 23

10 <210> 49
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Sintético

20 <400> 49
 gcaaggctta caaccacaat c 21

25 <210> 50
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 50
 cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agttatgata tcaactgggt gcgacaggcc 120
 actggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atgaacccta atagtggtaa gacaggctat 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcgccatg accaggaaaa cctccataag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaggac 300
 tacagtaact acggggactt tgactactgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca 360
 gtgcccaggg attgtggttg t 381

40 <210> 51
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Sintético

50 <400> 51
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Lys Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Ala Met Thr Arg Lys Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Asp Tyr Ser Asn Tyr Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 115 120 125

55 <210> 52
 <211> 378

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 52

```
caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag atgaagaagc ctgggggcctc agtgaagggtc 60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacatactat 180
gcacagaacc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cgcagccttc 240
atggacctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatggg 300
tatagtacct cgtccttaga ctactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctcagtg 360
cccagggatt gtggttgt                                     378
```

<210> 53
<211> 126
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 53

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

<210> 54
<211> 378
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 54

```
caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag atgaagaagc ctgggggcctc agtgaagggtc 60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacatactat 180
gcacagaacc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cgcagccttc 240
atggacctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatggg 300
tatagtacct cgtccttaga ctactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctcagtg 360
cccagggatt gtggttgt                                     378
```

ES 2 595 376 T3

<210> 55
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Sintético

10

<400> 55

```

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

```

15

<210> 56
 <211> 408
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Sintético

<400> 56

```

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggtc 60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatgat 300
atgattacgt ttgggggagt tatcgccaac tactactact acggtatgga cgtctggggc 360
caagggacca cggtcaccgt cacctcagtg cccagggatt gtggttgt 408

```

25

<210> 57
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> Sintético

35

<400> 57

ES 2 595 376 T3

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

<210> 58
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 58

cagggttcagt	tgctgcagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcctacaagg	cttctgatta	cacctttacc	agctatggta	tcagctgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggatgg	atcagcgctt	acaatggtaa	cacaaactat	180
gcacagaacc	tccagggcag	agtcaccatg	accacagaca	catccacgag	cacagcctac	240
atggaactga	ggagcctgag	atctgacgac	tcggccgtgt	attactgtgc	gagagaggag	300
ctggaacttt	ttgactactg	gggccaggga	accctgggtca	ccgtctcctc	agtgccccagg	360
gattgtgggt	gt					372

<210> 59
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 59

ES 2 595 376 T3

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

<210> 60
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 60

caggtccagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	ggtgaaggtc	60
tcttgcaagg	cttctggagg	caccttcagc	agctatgcta	tcagctgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggaggg	atcatcccta	tctttggtac	agcaaactac	180
gcacagaagt	tccagggcag	agtcacgatt	accacggacg	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagatggg	300
tatagtacct	cgtccttaga	ctactggggc	caggggaacc	tggtcaccgt	ctcctcagtg	360
cccagggatt	gtggttgt					378

<210> 61
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 61

ES 2 595 376 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Thr Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 115 120 125

<210> 62
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 62

cagggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tectgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttgttac agcaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accacggacg aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc ggttatagca 300
 gtggctggta cctactacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
 gtctcccttag tgcccaggga ttgtggttgt 390

<210> 63
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 63

ES 2 595 376 T3

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

<210> 64
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 64

tgacagtgtgta	atcacatata	ctttttcttg	tagtgcccag	ggattgtggt	tgtaagcctt	60
gcataatgtac	aggtaagtca	gtaggccttt	caccctgacc	c		101

REIVINDICACIONES

1. Un ratón transgénico que comprende una modificación de la línea germinal, modificación que comprende:

- (a) una delección de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio CH1 de un gen de la región constante de IgG endógena; y
 (b) una inclusión de uno o más segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada humana, en el que el uno o más segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada humana está operativamente enlazado a la región constante de IgG endógena (a); en el que el ratón comprende un gen de la región constante de IgM intacto, en el que el ratón expresa un anticuerpo de cadena pesada de IgG que comprende un dominio variable humano, que carece de un dominio CH1 funcional y que carece de una cadena ligera relacionada, y en el que el ratón secreta dicho anticuerpo de cadena pesada de IgG en su suero.

2. El ratón de la reivindicación 1, en el que la región constante del gen de IgG está seleccionada del grupo que consiste en un gen de la región constante de IgG1, un gen de la región constante de IgG2b, un gen de la región constante de IgG2a, y combinaciones de los mismos.

3. El ratón de la reivindicación 2, en el que la región constante del gen de IgG es un gen de la región constante de IgG1.

4. El ratón de la reivindicación 3, caracterizado por que el ratón expresa adicionalmente:

- (a) proteína IgG3 no mutante;
 (b) proteína IgG2a no mutante; y
 (c) proteína IgG2b no mutante.

5. El ratón de la reivindicación 4, caracterizado adicionalmente por que el ratón expresa:

- (a) proteína IgM no mutante;
 (b) proteína IgD no mutante;
 (c) proteína IgA no mutante; y
 (d) proteína IgE no mutante.

6. El ratón de la reivindicación 1, caracterizado por que el anticuerpo de cadena pesada de IgG carece del dominio CH1: (a) por completo; o (b) en parte.

7. El ratón de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo de cadena pesada de IgG comprende el dominio variable humano, una bisagra de IgG1, un dominio CH2 y un dominio CH3.

8. El ratón de la reivindicación 1, en el que el ratón comprende un locus del gen de la cadena ligera de la inmunoglobulina funcional.

9. El ratón de la reivindicación 8, en el que el locus del gen de la cadena ligera de la inmunoglobulina es un locus del gen de la cadena ligera κ .

10. El ratón de la reivindicación 8, en el que el locus del gen de la cadena ligera de la inmunoglobulina es un locus del gen de la cadena ligera λ .

11. El ratón de la reivindicación 1, en el que el ratón es de una cepa seleccionada del grupo que consiste en una cepa 129, una cepa C57BL/6 y una cepa 129xC57BL/6 mixta.

12. El ratón de la reivindicación 11, en el que el ratón es 50 % de 129 y 50 % de C57BL/6.

13. Una célula de ratón aislada, en la que la célula comprende una modificación que comprende:

- (a) una delección de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio CH1 de un gen de la región constante de IgG endógena; y
 (b) una inclusión de uno o más segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada humana, en la que el uno o más segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada humana está operativamente enlazado a la región constante de IgG endógena (a);

en la que la célula comprende un gen de la región constante de IgM intacto, en la que la célula expresa un anticuerpo de cadena pesada de IgG que comprende un dominio variable humano, que carece de un dominio CH1 funcional y que carece de una cadena ligera relacionada, y en la que la célula secreta dicho anticuerpo de cadena pesada de IgG.

14. Una célula madre embrionaria (ES) de ratón que comprende una modificación que comprende:

(a) una delección de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio CH1 de un gen de la región constante de IgG endógena; y

5 (b) una inclusión de uno o más segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada humana, en la que el uno o más segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada humana está operativamente enlazado a la región constante de IgG endógena (a);

10 en la que la célula ES comprende un gen de la región constante de IgM intacto, en la que la célula ES puede dar lugar a un ratón que expresa un anticuerpo de cadena pesada de IgG que comprende un dominio variable humano, que carece de un dominio CH1 funcional y que carece de una cadena ligera relacionada, y en la que el ratón secreta dicho anticuerpo de cadena pesada de IgG en su suero.

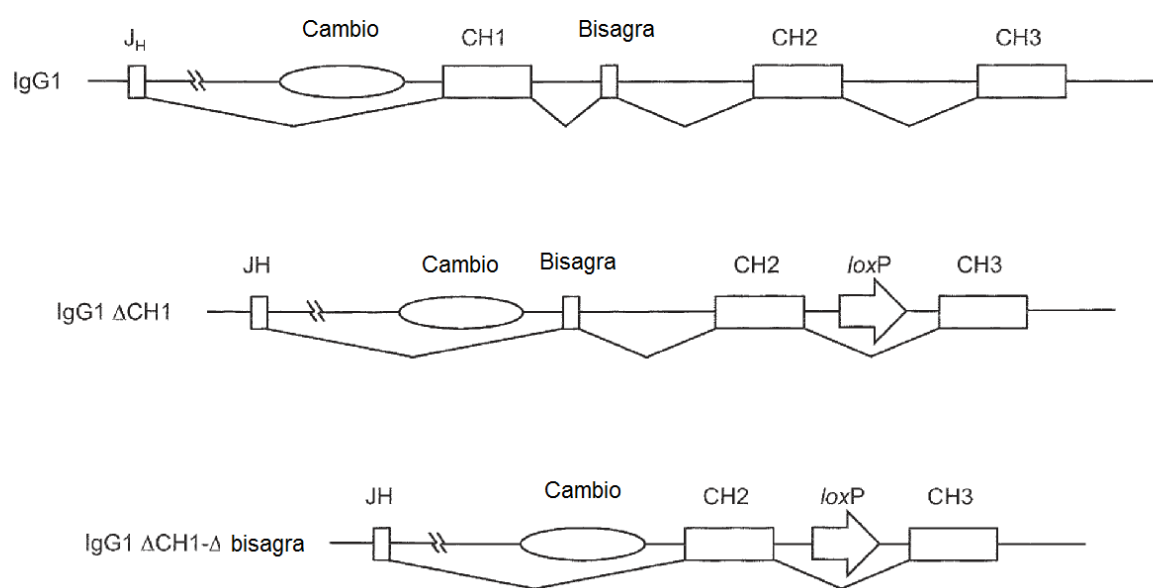


Figura 1

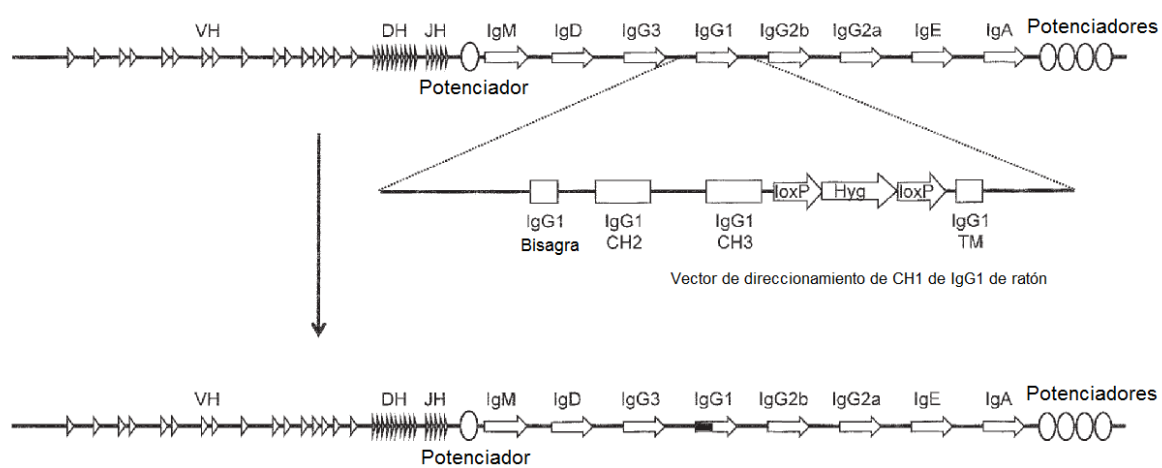


Figura 2

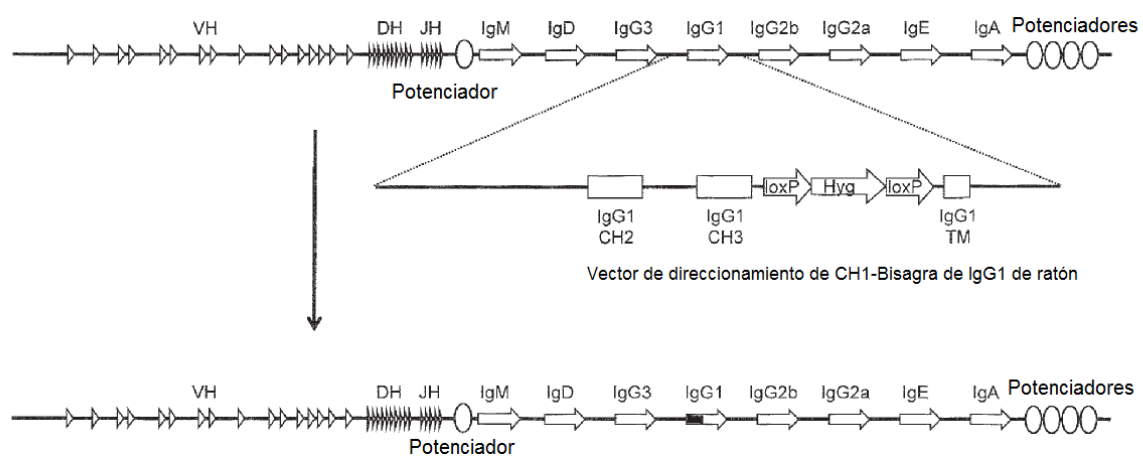


Figura 3

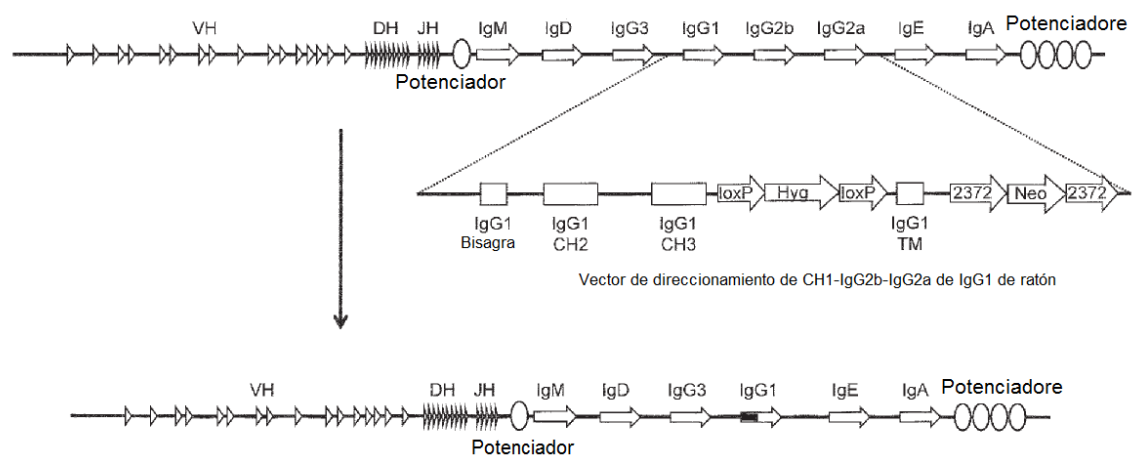


Figura 4

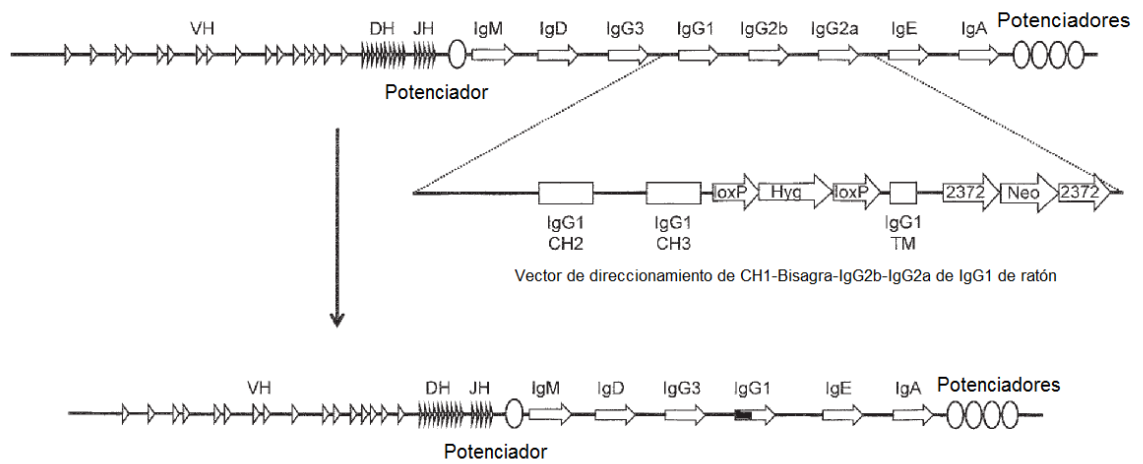


Figura 5

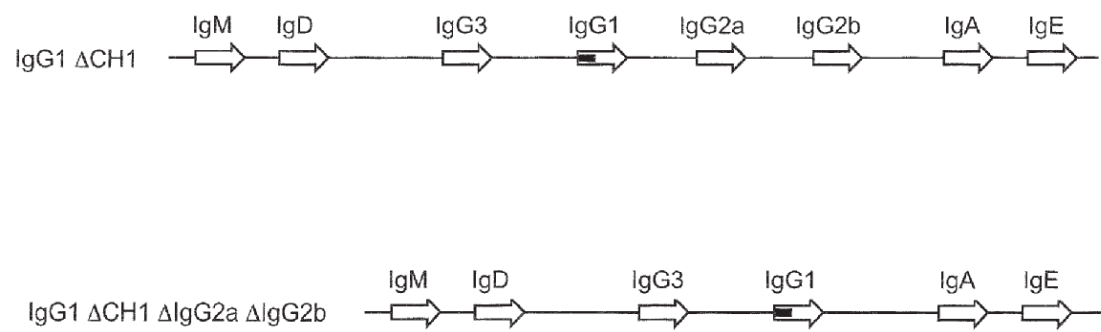


Figura 6

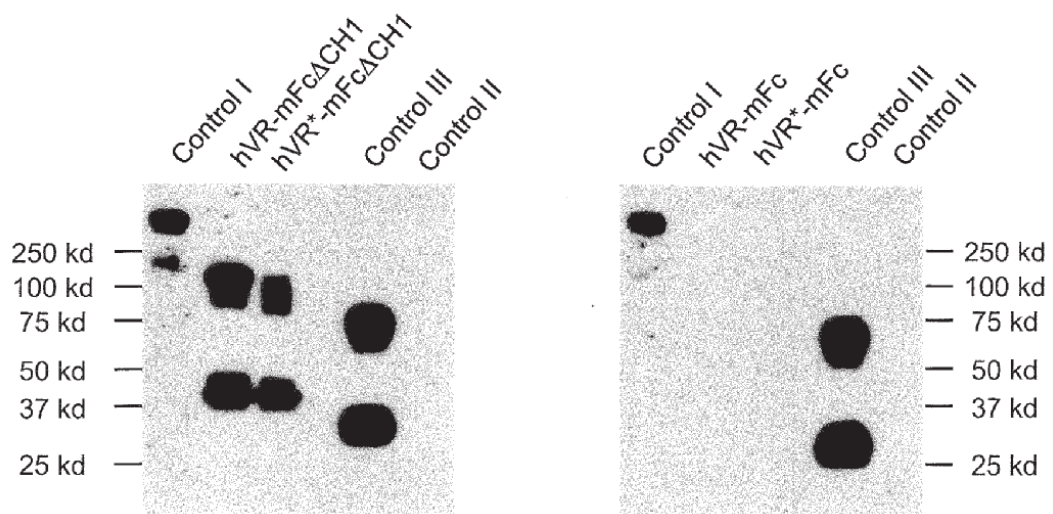


Figura 7

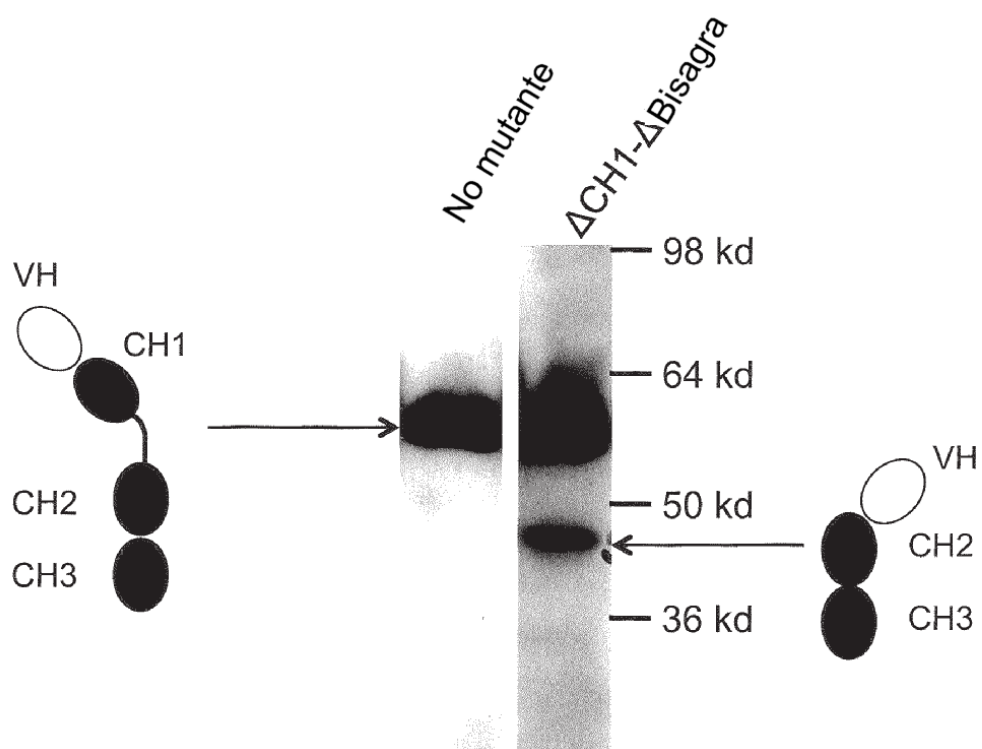


Figura 8

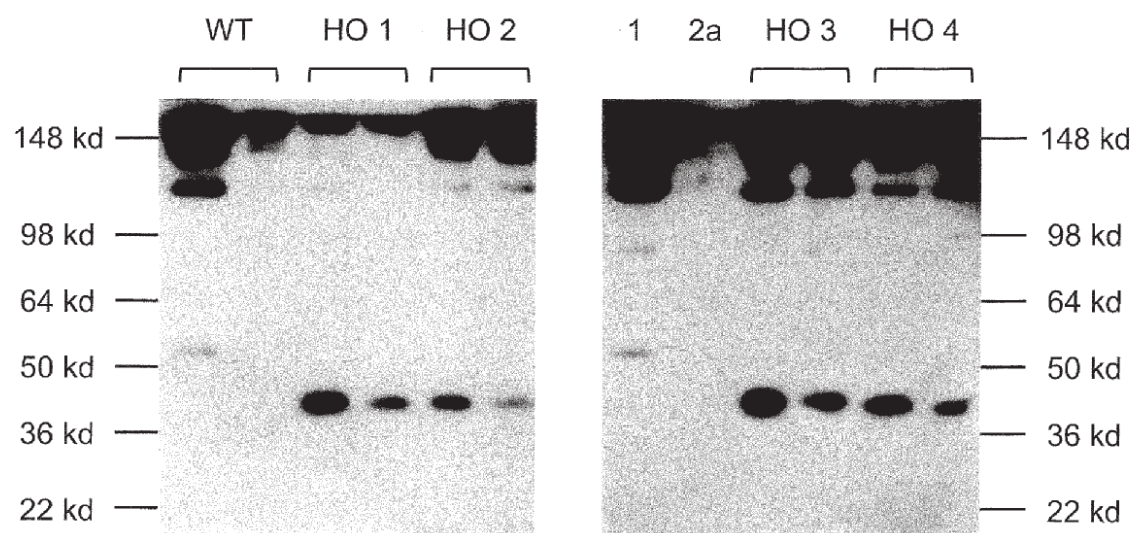


Figura 9

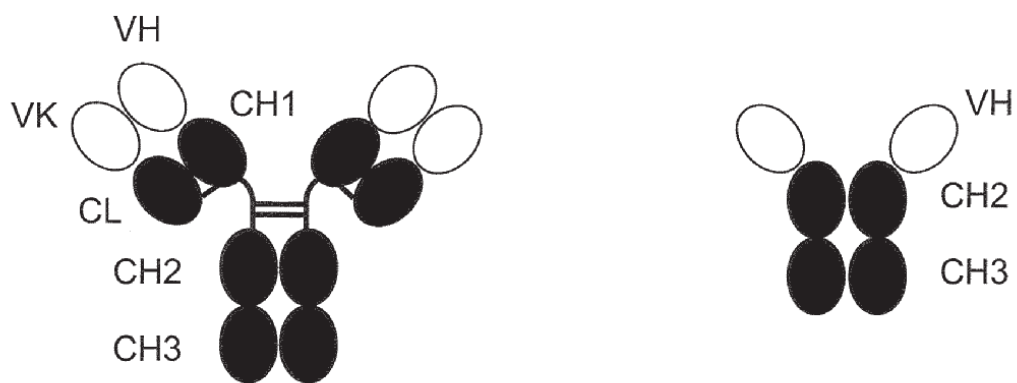


Figura 10

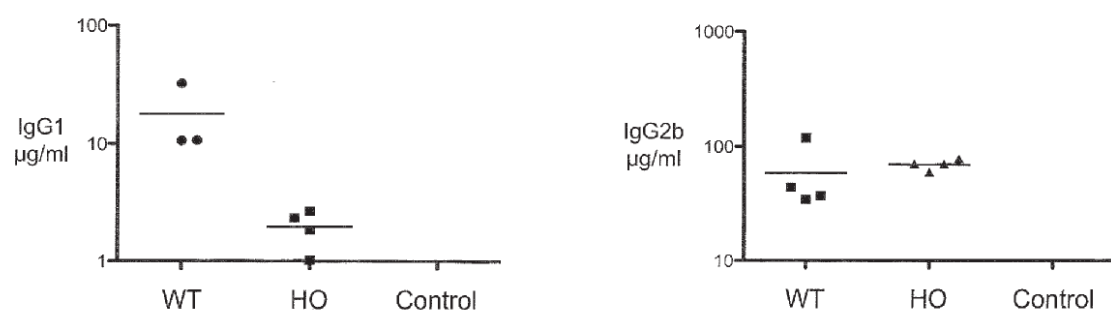


Figura 11

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
B1	EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCKTS	GYTFTSYG.	INWVKQRPGQGLEWIGY	IYIGNGYT..	EYNEKFK
B2	EVQLQQSGrELVKPGASVmISctAS	GYTFiDYf.	iNWmKrSHGqSLEWIGD	INPNNGGs..	nYNQKFK
B3	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS	GYTFTSYW.	MQWVKQRPGQGLEWIGE	IDPSDSYT..	NYNQKFK
B5	EVQLQQSGAEiVKsGASVKLSCTAS	GFNmKDYf.	iHWVKQRTEQGLEWIGR	lDPEDGkt..	KYAPKfQ
D2	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVT	GYSITSGYY	WNWIRQFPGNKLEWMGY	ISYDGrN...	NYNPSLK
D5	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTAS	GFNIKDY.	iHWVKkrPEQGLEWIGR	IDPEDGDT..	EYAPKfQ
D6	EVQLQQSGTELVKPGASaKLSCtAS	GFNvKDYf.	MHWVKQkTEQGLEWIGR	IVPEDGET..	KsAPKfQ
E2	EVKLVESGGGLVQSGRSLRLSCATS	GFTFSDFY.	MEWVRQAPGKGLEWIA	SRNKlNDYTp	EfsASVK
E8	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS	GYTFTSYW.	MHWVKQRPGRGLEWIGR	IDPNSGGT..	KYNEKlK
E10	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS	GYSFTGY.	MNWVKQSPEKSLEWIGE	INPSTGGT..	TYNQKFK
F6	EVQLVESGGDLVpGGSLKLSCAAS	GFTFSSYG.	MSWVRQTPDKRLEWVAT	ISSGGsYT..	YYPDSVK
	FR3	CDR3	FR4	CH2	
B1	GKATLTSDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYFr	ARGrvGPY.....YFDY	WGQGTTLTVSS	VPEVSSVFI	
B2	GKATLTVDKSSSTAYMdlRSLTSEDSAVYYC	AKLGRD.....WYFDV	WGtGTTVTVSS	VPEVSSVFI	
B3	GKATLTVDTSSTAYMQLSSLTpEDSAVYYC	ARCRY.....YFDY	WGQGTTLTVSS	VPEVSSVFI	
B5	GKATITADTSSNTAYLhLSSLTSEDtAVYYC	ARGGLGREE..YYAvDY	WGQGTSTVTVSS	VPEVSSVFI	
D2	NRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEdTATYYC	AIHTVVGd....YvMDY	WGQGTSTVTVSS	VPEVSSVFI	
D5	GKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDiAVYYC	TTSRpF.....YFDY	WGQGTTLTVSS	VPEVSSVFI	
D6	drtTlIrtDTSSNTshLQlnSLTSEDtAVYYC	ARPNP.....Y	WGQGTTLTVSv	VPEVSSVFI	
E2	GRFIVSRDTSQnILYLQMNALRpEDTAIYYC	ARAcSdYDR..YYAMDY	WGQGTSTVTVSS	VPEVSSVFI	
E8	nKATLTVDKPSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC	AREEINYYGSTYgAMDY	WGQGTSTVTVSS	VPEVSSVFI	
E10	AKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYC	AGG.....YWYFDV	WGtGTTVTVSS	VPEVSSVFI	
F6	GRFTISRDNakNTLYLQMSsLKsEDtAMYc	ARHDYyGSSYG.WYFDV	WGtGTTVTVSS	VPEVSSVFI	

Figura 12

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
A8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTSYD.	INWVRQATGQGLEWMGW	MNPNSGkT..	GYAQKFQ
C2	QVQLVQSGAE m KKPGASVKVSCKAS	GYTFTSYG.	ISWVRQAPGQGLEWMGW	ISAYNGNT..	yYAQnLQ
D9	QVQLVQSGAE m KKPGASVKVSCKAS	GYTFTSYG.	ISWVRQAPGQGLEWMGW	ISAYNCNT..	yYAQnLQ
C4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTSYG.	ISWVRQAPGQGLEWMGW	ISAYNGNT..	NYAQKLQ
H8	QVQLlQSGAEVKKPGASVKVSyKAS	dYTFTSYG.	ISWVRQAPGQGLEWMGW	ISAYNGNT..	NYAQnLQ
A5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS	GGTFSSYA.	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPIFGTA..	NYAQKFQ
A2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS	GGTFSSYA.	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPIFGTA..	NYAQKFQ
	FR3	CDR3	FR4	HINGE	
A8	GRVamTRkTSISTAYMELSSLRSED T AVYYC	ARedYSNYgd.....	FDY	WGQGTlLVTVSS	VPRDCGC
C2	GRVTMTTDTSTSaAfMdLRSLRSDDTAVYYC	ARdgyStSSl.....	DY	WGQGTlLVTVSS	VPRDCGC
D9	GRVTMTTDTSTSaAfMdLRSLRSDDTAVYYC	ARdgyStSSl.....	DY	WGQGTlLVTVSS	VPRDCGC
C4	GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC	ARddMITFGGVianYYYYGMDV		WGQGTlLVTVtS	VPRDCGC
H8	GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDsAVYYC	AReeLEl.....	FDY	WGQGTlLVTVSS	VPRDCGC
A5	GRVTITTDESTSTAYMELSSLRSED T AVYYC	ARdgyStSSl.....	DY	WGQGTlLVTVSS	VPRDCGC
A2	GRVTITTDESTSTAYMELSSLRSED T AVYYC	AvIAVAGT.....	YYYYGMDV	WGQGTlLVTVS1	VPRDCGC

Figura 13