

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 698**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/07 (2010.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2002 E 10178127 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2319301**

54 Título: **Animales transgénicos que portan genes de cadena ligera de Igλ humana**

30 Prioridad:

30.11.2001 US 334508 P

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

07.12.2017

73 Titular/es:

**AMGEN FREMONT INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799 , US**

72 Inventor/es:

**GREEN, LARRY L. y
IVANOV, VLADIMIR**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 645 698 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

Animales transgénicos que portan genes de cadena ligera de Ig λ humana

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a ratones transgénicos que se modifican mediante ingeniería genética para que contengan loci de inmunoglobulina humana. En particular, los animales descritos en este documento presentan loci de Ig humana que incluyen una pluralidad de regiones de genes de V_H y V _{λ} variables, y pueden incluir regiones de genes de V _{κ} . Ventajosamente, la inclusión de una pluralidad de genes de regiones variables potencia la diversidad de los anticuerpos humanos producidos por los ratones. Además, la inclusión de tales regiones potencia y reconstituye el desarrollo de células B en los ratones, de tal manera que los ratones presentan abundantes células B
10 maduras que secretan anticuerpos de alta afinidad que comprenden cadenas ligeras de Ig λ humana.

Antecedentes

15 La capacidad para clonar y reconstruir loci humanos con un tamaño de megabases en YAC e introducirlos en la línea germinal de ratón proporciona un potente enfoque para dilucidar los componentes funcionales de loci muy grandes o mapeados de manera aproximada así como para generar modelos útiles de enfermedad en seres humanos. Además, la utilización de tal tecnología para la sustitución de loci de ratón por sus equivalentes humanos podría proporcionar conocimientos únicos sobre la expresión y regulación de productos génicos humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas, y su implicación en la inducción y progresión de enfermedades.

20 Una aplicación de tal estrategia es la "humanización" del sistema inmunitario humoral del ratón. La introducción de loci de inmunoglobulina humana (Ig) en ratones en los que se han inactivado los genes de Ig endógena ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos subyacentes a la expresión programada y el ensamblaje de anticuerpos, así como su papel en el desarrollo de células B.

25 Además, la estrategia de humanizar el sistema inmunitario humoral de un ratón proporcionaría una fuente ideal para la producción de anticuerpos completamente humanos, particularmente anticuerpos monoclonales (AcM), un hito importante para cumplir con la promesa de terapia con anticuerpos en enfermedad de seres humanos. Se espera que los anticuerpos completamente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas frente a AcM no humanos (por ejemplo, de roedor) o derivatizados no humanos y, por tanto, aumenten la eficacia y la seguridad de los anticuerpos administrados. Puede esperarse que el uso de anticuerpos completamente humanos proporcione una ventaja sustancial en el tratamiento de enfermedades crónicas y recurrentes de seres humanos, tales como inflamación, autoinmunidad y cáncer, que requieren administraciones repetidas de anticuerpos.

30 La estrategia de humanizar un animal transgénico no humano para producir anticuerpos monoclonales completamente humanos también es importante porque evita los problemas que se encuentran con otros métodos de obtención de anticuerpos completamente humanos y anticuerpos que se han alterado para reducir los efectos inmunogénicos adversos, es decir, "anticuerpos humanizados". Aunque útiles, las técnicas de humanización tienen varias desventajas, incluyendo protocolos que requieren mucha mano de obra y posibles alteraciones de especificidad y/o afinidad de las regiones variables por el epítipo original, y contaminación de la región variable con secuencias no humanas residuales que pueden dar como resultado rechazo por parte del huésped. También ha demostrado ser difícil la producción eficaz de anticuerpos monoclonales humanos *in vitro*. Además, la mayor parte de los anticuerpos monoclonales humanos producidos *in vitro* han sido IgM, que se asocia a veces con formación de complejos inmunitarios e inflamación potenciada.

40 Un enfoque para lograr el objetivo de producir anticuerpos completamente humanos en animales transgénicos no humanos es modificar mediante ingeniería genética cepas deficientes en la producción de anticuerpos endógenos que producen anticuerpos humanos a partir de grandes fragmentos insertados de los loci de Ig humana. Los grandes fragmentos tienen la ventaja de conservar una gran diversidad de genes variables así como las secuencias necesarias para la regulación apropiada de la producción y expresión de anticuerpos. Aprovechando la maquinaria del huésped para la diversificación y selección de anticuerpos y la ausencia de tolerancia inmunológica frente a las proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducido en estas cepas modificadas mediante ingeniería genética incluye anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluyendo antígenos humanos. Luego, se producen fácilmente AcM humanos específicos de antígeno con la especificidad deseada y se seleccionan usando por ejemplo, la tecnología del hibridoma.

50 El éxito de esta estrategia general se demostró con relación a la generación de cepas de Xenomouse®. Véase por ejemplo, Green *et al.* Nature Genetics 7: 13-21 (1994). Las cepas de Xenomouse® se modificaron mediante ingeniería genética con fragmentos de configuración de línea germinal con un tamaño de 245 kb y 190 kb de un locus de cadena pesada humana y loci de cadena ligera κ humana, respectivamente, que contenían secuencias de regiones constantes y variables centrales en cromosomas artificiales de levadura (YAC). Los YAC que contienen Ig humana demostraron ser compatibles con el sistema de ratón tanto para la reorganización como para la expresión de anticuerpos. Además, los loci humanos sustituyeron los genes de Ig de ratón inactivados tal como se demostró
55 mediante su capacidad para soportar el desarrollo de células B y para generar un repertorio humano de tipo adulto

de anticuerpos completamente humanos.

Este enfoque se comenta adicionalmente y se describe en las patentes estadounidenses 5.939.598, 6.114.598, 6.075.181, 6.162.963 y 6.150.584; y en las solicitudes de patente internacional WO 96/22380 y WO98/24893. Véase también la patente europea EP 0 463 151 B1, y las solicitudes de patente internacional WO 94/02602, WO 96/34096 y WO 96/33735.

Nicholson *et al.* 1999 (J. Immunol. 163:6898-6906) describen un ratón transgénico que comprende un cromosoma artificial de levadura (YAC) integrado de manera estable que contiene una región de 380 kb del locus λ LC de Ig humana, y YAC integrados de manera estable que comprenden loci de HC humana y κ LC humana, mientras que se han perturbado los genes de HC y κ LC endógenas.

Kuroiwa *et al.* 2000 (Nature Biotechnology 18:1086-1090) describen una célula ES en la que se han inactivado HC y κ LC endógenas, que comprende un transcromosoma (cromosoma artificial humano que no se integra en el genoma del huésped) que comprende el locus de HC humana y el locus de λ LC humana completo.

Mahler *et al.* 1997 (Immunotechnology 3:31-43) describen el aislamiento de ácidos nucleicos que codifican para partes de unión a anticuerpo de λ LC y HC humanas.

Duell *et al.* .1997 (Genomics 45:479-486) dan a conocer el mapa físico del locus de Ig λ humana.

Un enfoque alternativo para producir anticuerpos completamente humanos utiliza un "minilocus" de Ig. En el enfoque de minilocus, se imita a un locus de Ig exógeno a través de la inclusión de fragmentos (genes individuales) del locus de Ig exógeno. Por tanto, se forman uno o más genes de V_H, uno o más genes de D_H, uno o más genes de J_H, una región constante mu, y una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma) para dar un constructo para la inserción en un animal. Se describe este enfoque en la patente estadounidense n.º 5.545.807 concedida a Surani *et al.* y las patentes estadounidenses n.ºs 5.545.806 y 5.625.825, ambas concedidas a Lonberg y Kay, y las solicitudes de patente estadounidense internacional de GenPharm n.ºs 07/574.748, presentada el 29 de agosto de 1990; 07/575.962, presentada el 31 de agosto de 1990; 07/810.279, presentada el 17 de diciembre de 1991; 07/853.408, presentada el 18 de marzo de 1992; 07/904.068, presentada el 23 de junio de 1992; 07/990.860, presentada el 16 de diciembre de 1992; 08/053.131, presentada el 26 de abril de 1993; 08/096.762, presentada el 22 de julio de 1993; 08/155.301, presentada el 18 de noviembre de 1993; 08/161.739, presentada el 3 de diciembre de 1993; 08/165.699, presentada el 10 de diciembre de 1993; y 08/209.741, presentada el 9 de marzo de 1994. Véanse también las solicitudes de patente internacional WO 94/25585, WO 93/12227, WO 92/22645 y WO 92/03918. Véanse además Taylor *et al.*, 1992, Chen *et al.*, 1993, Tuailon *et al.*, 1993, Choi *et al.*, 1993, Lonberg *et al.* (1994), Taylor *et al.* (1994) y Tuailon *et al.* (1995).

Una ventaja del enfoque de minilocus es la rapidez con que pueden generarse constructos que incluyen partes del locus de Ig e introducirse en animales. Sin embargo, una desventaja importante del enfoque de minilocus es que, en teoría, se introduce insuficiente diversidad a través de la inclusión sólo de pequeños números de genes de V, D y J. En efecto, los informes publicados, incluyendo la patente estadounidense 6.300.129, describen que el desarrollo de células B y la producción de anticuerpos en animales producidos mediante el enfoque de minilocus parecen restringidos.

Por consiguiente, existe la necesidad de producir ratones transgénicos que comprendan loci de Ig más completos que los que se han producido previamente para obtener ratones transgénicos que tengan un repertorio de anticuerpos humanos sustancialmente completo. La introducción de otros loci de Ig en un ratón transgénico puede permitir mayor diversidad de anticuerpos y sería probable que se reconstituyera un repertorio inmunitario más completo de los ratones. Por tanto, sería deseable proporcionar ratones transgénicos que contuviesen de manera estable secuencias de línea germinal de genes de V de Ig completos, particularmente que tuviesen secuencias de V λ de línea germinal. Adicionalmente, sería deseable proporcionar tales loci contra un contexto de desactivación de Ig endógena. Pueden usarse ratones que pueden producir tal repertorio para crear células inmortalizadas, tales como hibridomas, que producen anticuerpos monoclonales completamente humanos para fines tanto de diagnóstico como terapéuticos.

Sumario de la invención

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

La invención se refiere a ratones transgénicos que portan un locus λ de inmunoglobulina (Ig) humana sustancialmente completo, y que comprende además loci de cadena ligera κ y pesada de Ig humana.

Además, tales ratones pueden incluir toda la región D_H, toda la región J_H y la región constante mu humana, y pueden estar dotados adicionalmente de genes que codifican para otras regiones constantes humanas para la generación de isotipos adicionales. Tales isotipos pueden incluir genes que codifican para γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , α y genes que codifican para ϵ . Pueden incluirse regiones constantes adicionales en el mismo transgén, es decir, en el sentido de 3' desde la región constante mu humana, o, alternativamente, tales otras regiones constantes pueden incluirse en otro

cromosoma. Se apreciará que cuando se incluyen tales otras regiones constantes en el mismo cromosoma que el cromosoma que incluye el transgén que codifica para la región constante mu humana, puede realizarse un cambio de tipo *cis* al otro isotipo o isotipos. Por otro lado, cuando se incluye tal otra región constante en un cromosoma diferente del cromosoma que contiene el transgén que codifica para la región constante mu, puede realizarse un cambio de tipo *trans* al otro isotipo o isotipos. Tal organización permite una tremenda flexibilidad en el diseño y la construcción de ratones transgénicos para la generación de anticuerpos frente a una amplia serie de antígenos.

El ratón transgénico adicionalmente puede no producir adicionalmente inmunoglobulinas endógenas funcionales. Esto puede lograrse inactivando (por ejemplo, desactivando) los loci de Ig de cadena ligera λ y κ y pesada endógena usando métodos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento. Por ejemplo, pueden inactivarse los genes endógenos a través de la utilización de vectores de recombinación homóloga que reemplazan o delecionan la región. Se describen tales técnicas en detalle en las patentes estadounidenses 5.939.598, 6.114.598, 6.075.181, 6.162.963 y 6.150.584, en el documento WO 98/24893, y en publicaciones tales como Green *et al.* Nature Genetics 7: 13-21 (1994). Los ratones transgénicos pueden ser ratones de la línea Xenomouse®.

El ratón transgénico puede comprender loci de cadena ligera κ y cadena pesada endógena sustancialmente inactivos pero puede comprender un locus de cadena ligera λ endógeno activo. Los solicitantes han encontrado que la expresión endógena de la cadena ligera λ en ratones transgénicos es suficientemente baja de modo que no interfiere en la producción de anticuerpos que comprenden una cadena ligera λ humana.

El ratón transgénico puede tener un genoma modificado, en el que las modificaciones del genoma comprenden al menos un locus de inmunoglobulina endógena inactivado, de tal manera que el ratón no presentaría el desarrollo normal de células B; un locus de Ig de cadena ligera λ humana insertado en la configuración sustancialmente de línea germinal, el locus de Ig de cadena ligera λ humana que comprende una región constante λ humana, una pluralidad de genes de $J\lambda$ y una pluralidad de genes de $V\lambda$; un locus de Ig de cadena pesada humana insertado en la configuración sustancialmente de línea germinal, el locus de Ig de cadena pesada humana que comprende una región constante μ humana y secuencias reguladoras y de cambio para los mismos, una pluralidad de genes de J_H humanos, una pluralidad de genes de D_H humanos, y una pluralidad de genes de V_H humanos; y un locus de Ig de cadena ligera κ humana insertado en la configuración sustancialmente de línea germinal, comprendiendo el locus de Ig de cadena ligera κ humana una región constante κ humana, una pluralidad de genes de $J\kappa$ y una pluralidad de genes de $V\kappa$; en el que el número de genes de $V\lambda$, V_H y $V\kappa$ insertados son suficientes para restaurar sustancialmente el desarrollo normal de células B en el ratón.

El locus de Ig de cadena pesada puede comprender una segunda región constante seleccionada del grupo que consiste en todos los subtipos de gamma, alfa, delta y épsilon humanos. Cuando están presentes, el número de genes de V_H puede ser preferiblemente mayor de aproximadamente 20. El número de genes de $V\kappa$ puede ser mayor de aproximadamente 15. El número de genes de D_H puede ser mayor de aproximadamente 20, el número de genes de J_H puede ser mayor de aproximadamente 4, el número de genes de V_H puede ser mayor de aproximadamente 20, el número de genes de $J\kappa$ puede ser mayor de aproximadamente 4, el número de genes de $V\kappa$ puede ser mayor de aproximadamente 15 y el número de genes de $V\lambda$ puede ser mayor de aproximadamente 15, mayor de aproximadamente 20 o aproximadamente 25, o puede ser de aproximadamente 30. El número de pares $J\lambda$ - $C\lambda$ funcionales puede ser de cuatro.

El número de genes de D_H , el número de genes de J_H , el número de genes de V_H , el número de genes de $J\kappa$, el número de genes de $V\kappa$, el número de genes de $J\lambda$ y el número de genes de $V\lambda$ pueden seleccionarse de tal manera que los loci de Ig pueden codificar para más de aproximadamente 1×10^5 combinaciones de secuencias de anticuerpos funcionales diferentes en una población de animales transgénicos. Puede reconstituirse el desarrollo de células B en una población en promedio hasta más de aproximadamente el 50% en comparación con el tipo silvestre, o más del 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 95% en comparación con el tipo silvestre.

Se describe en el presente documento un ratón transgénico que tiene un genoma modificado que hace que el ratón pueda producir moléculas de inmunoglobulina humana pero no pueda producir sustancialmente moléculas de inmunoglobulinas endógenas funcionales en el que el genoma del ratón comprende suficientes genes de $V\lambda$, pares $J\lambda$ - $C\lambda$, V_H , D_H , J_H , $V\kappa$ y $J\kappa$ humanos para codificar para un repertorio de anticuerpos de al menos aproximadamente 1×10^6 combinaciones diferentes de secuencias de inmunoglobulina humana funcionales. El número de genes de $V\lambda$, V_H y $V\kappa$ humanos puede ser suficiente para restaurar sustancialmente el desarrollo normal de células B en el mamífero. El desarrollo de células B en una población de mamíferos puede reconstituirse en promedio hasta más de aproximadamente el 50% en comparación con el tipo silvestre, o más del 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 95% en comparación con el tipo silvestre.

También se describe en el presente documento un ratón transgénico que tiene un genoma modificado que comprende un locus de inmunoglobulina de cadena pesada endógena inactivado; un locus de Ig de cadena pesada humana insertado que comprende sustancialmente la totalidad del locus de cadena pesada humana o que comprende una secuencia de ácido nucleico correspondiente sustancialmente a la secuencia de ácido nucleico de un locus de cadena pesada humana; un locus de Ig de cadena ligera κ humana insertado que comprende sustancialmente la totalidad del locus de Ig de cadena ligera κ o una secuencia de ácido nucleico correspondiente

sustancialmente a la secuencia de ácido nucleico del locus de Ig de cadena ligera κ ; y un locus de Ig de cadena ligera λ humana insertado que comprende sustancialmente la totalidad del locus de Ig de cadena ligera λ o que comprende una secuencia de ácido nucleico correspondiente sustancialmente a la secuencia de ácido nucleico de λ L. El ratón transgénico puede comprender además loci de Ig de cadena ligera κ y/o λ endógena inactivados.

5 Se describe además en el presente documento un ratón transgénico que tiene un genoma modificado que comprende un locus de inmunoglobulina de cadena pesada endógena inactivado; un locus de Ig de cadena pesada humana insertado que comprende una secuencia de ácido nucleico correspondiente sustancialmente a la totalidad del locus de cadena pesada humana pero que carece de la región constante $\gamma 2$ humana; un locus de Ig de cadena ligera κ humana insertado que comprende una secuencia de ácido nucleico correspondiente sustancialmente a la
 10 secuencia de ácido nucleico del locus de Ig de cadena ligera κ ; y un locus de Ig de cadena ligera λ humana insertado que comprende sustancialmente la totalidad del locus de Ig de cadena ligera λ o que comprende una secuencia de ácido nucleico correspondiente sustancialmente a la secuencia de ácido nucleico del locus de Ig de cadena ligera λ . El ratón transgénico puede comprender además loci de Ig de cadena ligera κ y/o λ endógena inactivados.

15 También se describe en el presente documento un método para producir un ratón transgénico que tiene un genoma modificado, en el que el método comprende introducir un locus de Ig de cadena ligera λ humana o una parte del mismo en una célula, e introducir opcionalmente un locus de Ig de cadena pesada humana y/o locus de Ig de cadena ligera κ humana en la célula, y manipular la célula para producir un ratón transgénico. El locus de inmunoglobulina puede introducirse usando un cromosoma artificial de levadura (YAC) que comprende el locus de
 20 inmunoglobulina humana. También se describen en el presente documento ratones transgénicos y las crías transgénicas de los mismos producidas a través de este método.

Se describe además en el presente documento un ratón transgénico que tiene un genoma modificado que comprende un transgén de Ig de cadena pesada humana insertado, un transgén de Ig de cadena ligera λ humana insertado y un transgén de Ig de cadena ligera κ humana insertado, en el que los transgenes comprenden conjuntos
 25 seleccionados de genes de regiones variables humanas que permiten una diversidad de unión similar a la humana y longitudes de la región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) similares a la humana. En un aspecto, la diversidad de unión similar a la humana de la cadena pesada comprende longitudes de N-adición promedio de 7,7 bases. Las longitudes de CDR3 de cadena pesada similares a la humana pueden comprender entre aproximadamente 2 y aproximadamente 25 residuos con un promedio de aproximadamente 14 residuos.

30 También se describe en el presente documento un método para producir líneas celulares inmortalizadas y los anticuerpos humanos producidos por las mismas que comprende inmunizar un ratón transgénico no humano de la divulgación con un antígeno; recoger e inmortalizar células linfocíticas para obtener una población de células inmortalizadas; identificar y aislar qué poblaciones de células específicas secretan anticuerpos humanos que se unen específicamente al antígeno con una afinidad mayor de $10^9 M^{-1}$; y aislar los anticuerpos de las poblaciones de
 35 células.

También se describen en el presente documento anticuerpos policlonales que comprenden moléculas de cadena ligera λ humana derivadas de los ratones transgénicos de la divulgación. En un aspecto, los anticuerpos policlonales comprenden además una cadena pesada humana.

40 También se describen en el presente documento moléculas de ácido nucleico que comprenden un locus de Ig de cadena ligera λ humana de longitud completa y moléculas de ácido nucleico que codifican para cadenas ligeras λ humanas de anticuerpos producidos por los ratones transgénicos o células de la divulgación.

Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el locus λ de inmunoglobulina humana que comprende 30 genes funcionales de $V\lambda$, y siete pares $J\lambda$ - $C\lambda$, de los que cuatro son funcionales.

45 La figura 2 muestra la reconstrucción del locus λ de inmunoglobulina humana en el YAC designado como λ L.

La figura 3 es un diagrama que muestra la expresión de $Ig\lambda$ humana e $Ig\kappa$ humana en cepas de Xenomouse®-KL.

La figura 4 presenta un resumen de los experimentos de fusión descritos en el ejemplo 8.

La figura 5 es un diagrama que muestra los niveles en suero de anticuerpos humanos en ratones Xenomouse®-KL no expuestos previamente.

50 Las figuras 6A-G son análisis de transferencia de tipo Southern que demuestran la integración de genes de inmunoglobulina λ de línea germinal humana en células madre embrionarias (ES) células y cepas de Xenomouse.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se describe la generación y caracterización de varias cepas de ratones que comprenden un locus de cadena ligera de Ig λ de línea germinal humana o una parte del mismo. También se describe la producción de ratones transgénicos que comprenden además un locus de cadena ligera κ de línea germinal humana o una parte del mismo y un locus de cadena pesada de línea germinal humana o una parte del mismo. Por tanto, la presente invención se refiere a ratones transgénicos que comprenden los loci de Ig humana grandes y complejos para reemplazar funcionalmente los loci de ratón correspondientes. Se describen en el presente documento métodos para producir los ratones transgénicos usando YAC que comprenden el locus de línea germinal λ humana y la introducción satisfactoria de los YAC con un tamaño de megabases en ratones transgénicos. También se describen en el presente documento células madre embrionarias que dan lugar a los ratones transgénicos así como métodos para producir las células madre embrionarias. Se describen además en el presente documento anticuerpos producidos por los ratones transgénicos, tanto policlonales como monoclonales, y proporciona composiciones y métodos relacionados con células inmortalizadas, por ejemplo hibridomas, que producen los anticuerpos monoclonales.

Definiciones

Los términos en el presente documento tienen generalmente su significado habitual que entienden los expertos habituales en la técnica. Se pretende que los siguientes términos tengan los siguientes significados generales tal como se usan en el presente documento:

“Repertorio de anticuerpos” se refiere a la suma de cada una de las diferentes especies de anticuerpo en un animal o ser humano. Resulta, entre otros, diversidad en repertorios de anticuerpos de la recombinación de genes de inmunoglobulina, diversidad de unión de genes de inmunoglobulina, actividad desoxinucleótido transferasa terminal, actividad exonucleasa, edición de receptor e hipemutación somática.

“Células linfocíticas B o progenie de las mismas” se refieren a cualquier célula que desciende de, o destinada para, el linaje linfocítico B. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, todos los linfocitos B en la ruta de desarrollo de células B que empieza a partir de las primeras células madre de linfocitos B a través de células B de memoria, células plasmáticas y cualquier línea celular inmortalizada tal como hibridomas.

“Células madre embrionarias (ES)” se refieren a células pluripotentes o multipotentes que pueden contribuir, cuando se inyectan en un blastocisto, a muchos o todos los tejidos de un animal no humano prenatal, posnatal o adulto. Los animales que resultan de inyecciones en blastocistos se denominan a menudo animales “quiméricos” puesto que sus células somáticas y/o germinales se derivan a menudo tanto de los donantes de blastocistos como de las células ES que se inyectaron.

“Células inmortalizadas” se refieren a células que se han alterado *in vitro* o *in vivo* para que crezcan y se dividan indefinidamente. Los métodos de inmortalización de células incluyen, pero no se limitan a, transformarlas con oncogenes, infectarlas con virus oncogénicos, cultivarlas en condiciones que seleccionan células inmortalizadas, someterlas a compuestos carcinogénicos o que producen mutaciones, fusionarlas con una célula de otra línea celular inmortal, por ejemplo, una célula de mieloma, e inactivar genes supresores de tumores.

“Esferoplasto” se refiere a una célula de levadura a la que se le ha quitado *in vitro* su pared celular, lo que da como resultado células de levadura con membranas citoplasmáticas expuestas susceptibles de fusión con otras células, por ejemplo, células ES.

“Configuración de línea germinal” se refiere a la organización y separación de los segmentos de genes de inmunoglobulina antes de que se haya producido cualquier reorganización génica somática.

“Lesión genética” se refiere a cualquier perturbación natural o no natural en genes o loci. Las lesiones genéticas dan como resultado la reducción o ausencia de expresión de genes o loci o alternativamente dan como resultado la expresión de productos génicos así alterados para eliminar sus funciones naturales. Las lesiones genéticas incluyen, pero no se limitan a, perturbación dirigida de secuencias codificantes de locus o genes, alteraciones de elementos reguladores de tipo *cis* asociados con la expresión de los genes o loci, alteraciones de factores reguladores de tipo *trans* asociados con la expresión de los genes o loci, y perturbaciones macroscópicas de cromosomas completos, o regiones de los mismos, que comprenden los genes o loci.

“Elementos reguladores de tipo *cis*” se refieren generalmente a secuencias que regulan la expresión inducible o constitutiva de secuencias génicas en el mismo cromosoma en condiciones específicas o en células específicas. Los ejemplos de procesos celulares que regulan las secuencias de control de la expresión incluyen, pero no se limitan a, transcripción génica, recombinación génica somática, corte y empalme de ARN mensajero, traducción de proteínas, cambio de isotipo de inmunoglobulina, glicosilación de proteínas, escisión de proteínas, secreción de proteínas, localización de proteínas intracelulares y asentamiento de proteínas extracelulares.

“Locus de inmunoglobulina transgénica sustancialmente completo” se refiere a entre el 50% y el 100% de un locus de inmunoglobulina derivado de un animal distinto del animal huésped. Un locus de inmunoglobulina transgénica sustancialmente completo se refiere a entre el 75% y el 100%, entre el 90% y el 100% o entre el 95% y el 100% o incluso más preferido a aproximadamente del 98 al 100% de un locus de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina

derivado de un animal distinto del animal huésped.

“Loci de inmunoglobulina endógena sustancialmente inactivados” se refiere a un animal que tiene una lesión genética en su loci de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada, lo que da como resultado la pérdida de expresión de los loci dentro del animal. La expresión de los loci de inmunoglobulina endógena inactivados puede ser de entre el 0% y el 30% de los niveles de expresión de tipo silvestre. En una realización más preferida, la expresión de los loci de inmunoglobulina endógena inactivados puede ser de entre el 0% y el 15% de los niveles de expresión de tipo silvestre. En la realización más preferida, la expresión de los loci de inmunoglobulina endógena inactivados es de aproximadamente el 0% al 5%, más preferiblemente del 0% al 1% de los niveles de expresión de tipo silvestre.

Una secuencia de ácido nucleico “corresponde sustancialmente”, “que corresponde sustancialmente” o es “sustancialmente similar” a la secuencia de ácido nucleico de un locus de cadena pesada, cadena ligera λ o cadena ligera κ de Ig humana cuando (a) la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico se hibrida con la molécula de ácido nucleico que comprende un locus de cadena pesada, cadena ligera λ o cadena ligera κ de Ig humana en condiciones altamente rigurosas y/o (b) la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico presenta similitud de secuencia sustancial con la molécula de ácido nucleico que comprende un locus de cadena pesada, cadena ligera λ o cadena ligera κ de Ig humana. Un ejemplo de condiciones “de alta rigurosidad” o “altamente rigurosas” es un método de incubación de un polinucleótido con otro polinucleótido, en el que un polinucleótido puede fijarse a una superficie sólida tal como una membrana, en un tampón de hibridación de 6X SSPE o SSC, formamida al 50%, reactivo de Denhardt 5X, SDS al 0,5%, ADN de esperma de salmón fragmentado, desnaturalizado 100 $\mu\text{g/ml}$ a una temperatura de hibridación de 42°C durante 12-16 horas, seguido por lavado dos veces a 55°C usando un tampón de lavado de 1X SSC, SDS al 0,5%. Véase también Sambrook *et al.*, citado anteriormente, págs. 9.50-9.55. Similitud de secuencia sustancial indica que, cuando se alinea de manera óptima con las inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), hay identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente el 85%, preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de las bases nucleotídicas, tal como se mide mediante cualquier algoritmo de identidad de secuencia bien conocido, tal como FASTA, BLAST o Gap, que son programas en Wisconsin Package versión 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, que incluye, por ejemplo, los programas FASTA2 y FASTA3, proporciona alineaciones y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol.* 183: 63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132: 185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266: 227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276: 71-84 (1998)).

Cromosomas artificiales de levadura (YAC) se refieren a vehículos de clonación construidos a partir de elementos de cromosomas de levadura que permiten que se replique el vector y se mantenga en células de levadura *in vivo*. Los elementos de levadura incluyen un centrómero, una secuencia de replicación autónoma, un par de telómeros, marcadores seleccionables de levadura, y habitualmente un origen de replicación bacteriano y un marcador seleccionable para la replicación y selección de los brazos de vector de YAC en bacterias. Pueden clonarse insertos de ADN de hasta al menos 2000 kb y mantenerse usando YAC.

“Animales transgénicos” se refieren a animales que portan partes sustanciales de loci de inmunoglobulina humana. A menudo, los animales transgénicos portan loci de inmunoglobulina endógena dirigidos de manera homóloga, que hacen que sean incapaces de expresar su inmunoglobulina endógena. Un ejemplo comprende los ratones de la línea XenoMouse®, por ejemplo, las líneas XenoMouse-L y XenoMouse-KL descritas en el presente documento, que pueden producir una reorganización somática de genes de inmunoglobulina humana transgénica, hipermutación de los genes variables humanos, expresión de genes de inmunoglobulina y cambio de isotipo de inmunoglobulina. Por tanto, los ratones de la línea XenoMouse® pueden generar respuestas humorales eficaces frente a la exposición antigénica utilizando secuencias de genes de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos producidos en los ratones de la línea XenoMouse® son completamente humanos y pueden aislarse de los propios animales o la progenie de los mismos, de células cultivadas extraídas de los animales o la progenie de los mismos, y de hibridomas creados a partir de las líneas de linfocitos B XenoMouse-L y XenoMouse-KL o la progenie de los mismos. Además, las secuencias de genes humanos reorganizadas que codifican para inmunoglobulinas producidas contra exposiciones antigénicas específicas pueden aislarse mediante medios recombinantes bien conocidos en la técnica.

Un “anticuerpo” se refiere a una inmunoglobulina intacta o a una parte de unión a antígeno de la misma que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica. Pueden producirse partes de unión a antígeno mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Las partes de unión a antígeno incluyen, entre otros, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dAc y de región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos y polipéptidos que contienen al menos una parte de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión a antígeno específico al polipéptido.

“Anticuerpos transgénicos” se refieren a anticuerpos que están codificados por loci de inmunoglobulina foránea. Por ejemplo, en ratones de las líneas XenoMouse-L y XenoMouse-KL, los loci de anticuerpo humano codifican para anticuerpos transgénicos.

“Anticuerpos monoclonales transgénicos” se refieren a poblaciones homogéneas de anticuerpos que se producen en células clonadas, immortalizadas, por ejemplo hibridomas, derivadas de animales transgénicos no humanos. Por ejemplo, los hibridomas producidos a partir de ratones de las líneas XenoMouse-L y XenoMouse-KL producen anticuerpos monoclonales transgénicos.

- 5 El término “proteína aislada”, “polipéptido aislado”, “anticuerpo aislado” o “inmunoglobulina aislada” es una proteína, un polipéptido, un anticuerpo o una inmunoglobulina, respectivamente, que en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no se asocia con componentes asociados de manera natural que le acompañan en su estado nativo, (2) está libre de otras proteínas de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente o (4) no se produce en la naturaleza. Por tanto, un polipéptido o anticuerpo que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula a partir de la que se origina de manera natural estará “aislado” de sus componentes asociados de manera natural. Una proteína o un anticuerpo también puede hacerse que esté sustancialmente libre de componentes asociados de manera natural mediante aislamiento, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica. Un anticuerpo aislado puede ser aquel que no se asocia con otros anticuerpos con los que se asocia de manera natural que le acompañan en su estado nativo. Los ejemplos de anticuerpos aislados incluyen un anticuerpo humano que se ha purificado por afinidad usando un antígeno, una proteína A o proteína L, un anticuerpo humano que se ha sintetizado por un hibridoma u otra línea celular *in vitro*, y un anticuerpo humano derivado de un ratón transgénico.

- Una proteína, un polipéptido, anticuerpo o una inmunoglobulina es “sustancialmente puro/pura”, “sustancialmente homogéneo/homogénea” o “sustancialmente purificado/purificada” cuando al menos de aproximadamente el 60 al 75% de una muestra presenta una sola especie de la proteína, el polipéptido, el anticuerpo o la inmunoglobulina, respectivamente. Una proteína, un polipéptido, un anticuerpo o una inmunoglobulina sustancialmente puro/pura normalmente comprenderá aproximadamente el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% p/p de una muestra, más habitualmente el 95% aproximadamente, y preferiblemente más del 99% de pureza. La pureza u homogeneidad puede indicarse mediante varios medios bien conocidos en la técnica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra proteica, seguido por visualización de una sola banda de polipéptido tras la tinción del gel con una tinción bien conocida en la técnica. Para determinados fines, puede proporcionarse una mayor resolución usando HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica para purificación.

Estructura de los anticuerpos

- Se sabe que la unidad estructural de anticuerpo básica comprende un tetrámero. Cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena “ligera” (de aproximadamente 25 kDa) y una “pesada” (de aproximadamente 50-70 kDa). Por tanto, un anticuerpo IgG intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son iguales. Para anticuerpos IgM secretados, la unidad básica es un tetrámero de anticuerpos bivalentes. Por tanto, cada anticuerpo IgM pentamérico tiene diez sitios de unión. Para anticuerpos IgA secretados, la unidad básica es un tetrámero de anticuerpos bivalentes. Por tanto, cada anticuerpo IgA tetramérico tiene cuatro sitios de unión. La parte amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 aminoácidos o más principalmente responsables del reconocimiento de antígeno. La parte carboxilo terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa (κ) y lambda (λ). Las cadenas pesadas se clasifican como mu (μ), delta (δ), gamma (γ), alfa (α) o épsilon (ϵ), y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes se unen mediante una región “J” de aproximadamente 12 aminoácidos o más, también incluyendo la cadena pesada una región “D” de aproximadamente 10 aminoácidos o más. Véase generalmente, Fundamental Immunology cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N. Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo.

- 45 Todas las cadenas muestran la misma estructura general de regiones de marco (FR) relativamente conservadas unidas mediante tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean mediante las regiones de marco, permitiendo la unión a un epítipo específico. Desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal, ambas cadenas ligeras y pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es según las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Chothia *et al.* Nature 342: 878-883 (1989).

Desarrollo de células B

- El desarrollo de células B se inicia en la médula ósea con una recombinación de delección entre un gen de D y J. Posteriormente, un gen de V se recombina con DJ para producir VDJ, que se transcribe, produciendo un transcrito, VDJ μ sometido a corte y empalme. Si el transcrito está en marco, luego se sintetiza una cadena μ tras la traducción. De manera similar, y generalmente tras la recombinación V_HDJ_H y el apareamiento satisfactorio de la cadena μ con la cadena ligera sustituta, los loci de cadena ligera de Ig reorganizan sus segmentos de genes de V y J. El desarrollo satisfactorio de células B en la médula ósea da como resultado células B que expresan IgM κ o IgM λ , en la superficie celular. En el ratón, el 95% de las células B expresan IgM κ y el 5% expresan IgM λ ; en el ser

humano, aproximadamente el 60% de las células B expresan IgM κ y el 40% expresan IgM λ .

Estas células B que producen IgM forman el repertorio inmunitario primario y realizan una vigilancia inmunitaria para el reconocimiento de antígenos foráneos. En el ratón o en seres humanos, estas células B que producen IgM pueden experimentar posteriormente cambio de clase de isotipo de IgM a los isotipos IgG o IgA, o IgE. La frecuencia de cambio de clase aumenta durante una respuesta inmunitaria. Los ratones y seres humanos tienen cada uno genes para cuatro isotipos diferentes de IgG. Son IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 en el ratón, e IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 en el ser humano. Los seres humanos tienen dos isotipos de IgA, IgA1 e IgA2, y un isotipo de IgE. En un ratón, hay en promedio, 6500, 4200 y 1200 $\mu\text{g/ml}$ de IgG1, IgG2a e IgG2b, respectivamente, y 260 $\mu\text{g/ml}$ de IgA. En el ser humano, de la IgG total, aproximadamente el 70% es IgG1, el 18% es IgG2, el 8% es IgG3 y el 3% es IgG4. En la IgA total en seres humanos, aproximadamente el 80% es IgA1 y el 20% es IgA2.

Locus de inmunoglobulina λ humana

El locus de Ig λ humana abarca 0,9 Mb. Existen aproximadamente 69 segmentos de genes de V λ , de los que 36 tienen marcos de lectura abiertos. De estos, 30 se han detectado en transcritos de linfocitos de sangre periférica (PBL) humanos. Los genes de V λ se clasifican en 3 agrupaciones que, de 5' a 3', se designan como agrupación C, agrupación B y agrupación A. La agrupación A contiene 14 segmentos génicos de V λ funcionales y representa aproximadamente el 62% del repertorio expresado, la agrupación B contiene 11 genes de V λ , representando el 33% del repertorio expresado, y la agrupación C contiene 5 genes de V λ , representando el 5% del repertorio expresado. El repertorio expresado se basa en la frecuencia de representación de genes de V λ en el repertorio expresado por PBL humanos. Véase, por ejemplo, Ignatovich *et al.*, J. Mol. Biol., 268: 69-77, 1997. Diez familias de genes de V λ están representadas en estas agrupaciones. La familia más grande, V λ III, tiene 23 miembros, ocho de los cuales son funcionales. Hay siete pares J λ -C λ en el locus λ humano, de los que cuatro son funcionales.

Usos de anticuerpos humanos y animales transgénicos no humanos que los producen

La administración de anticuerpos de ratón o rata a un paciente humano habitualmente es ineficaz porque la presencia de secuencias derivadas de ratón o rata en anticuerpos puede conducir al rápido aclaramiento de los anticuerpos o a la generación de una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo por un paciente. Los anticuerpos humanos evitan algunos de los problemas asociados con los anticuerpos que presentan regiones variables y/o constantes de ratón o rata. Debido a que la creación de anticuerpos monoclonales humanos usando células derivadas de seres humanos era problemática, se deseaba desarrollar animales transgénicos que pudieran producir anticuerpos humanos.

La integración de transgenes de YAC con Ig humana en los cromosomas del huésped proporciona una estabilidad genética excepcional. Los transgenes de YAC con Ig humana integrados están representados de manera estable en todos los tejidos somáticos y de línea germinal de un animal transgénico, se transmiten de una generación a otra con el patrón esperado de herencia mendeliana y se mantienen de manera estable en células cultivadas, por ejemplo, hibridomas. En cambio, los transcromosomas humanos que se segregan libremente insertados en el núcleo de una célula huésped, por ejemplo, una célula ES de ratón, se sabe que son inestables genéticamente y se pierden. Pueden derivarse ratones quiméricos de estas células ES y en ocasiones pueden transmitir el transcromosoma a la descendencia. Ratones "transcromosómicos" derivados de estos ratones quiméricos son mosaicos somáticos, presentando algunas células el transcromosoma y habiendo perdido otras. La pérdida es probable que se produzca debido a la captura ineficaz del centrómero humano en el transcromosoma por el huso mitótico y meiótico del ratón, con posterior segregación aberrante de los transcromosomas durante la mitosis y meiosis. Además, también se espera que sean inestables los hibridomas de ratones transcromosómicos.

Se han introducido fragmentos de YAC con configuración de línea germinal, con un tamaño de megabases de los loci de cadena pesada humana y loci de cadena ligera κ en ratones transgénicos para producir ratones Xenomouse IIa. Véanse Mendez *et al.* Nature Genetics 15: 146-156 (1997), Green y Jakobovits J. Exp. Med. 188: 483-495 (1998) y el documento WO 98/24893.

La invención proporcionada en el presente documento se construye sobre la base de la tecnología pionera de Xenomouse® dando a conocer animales transgénicos no humanos que comprenden loci de cadena ligera λ humana. La invención se refiere a ratones que comprenden un locus de cadena ligera λ humana sustancialmente completo o una parte del mismo y que comprenden además loci de cadena pesada y cadena ligera κ humana. Los ratones transgénicos pueden comprender además genes de cadena pesada y cadena ligera κ endógenos sustancialmente inactivados o pueden comprender además genes de cadena pesada, cadena ligera κ y cadena ligera λ endógenos sustancialmente inactivados. En seres humanos, aproximadamente el 40% de los anticuerpos comprenden cadenas ligeras λ mientras que el 60% restante comprenden cadenas ligeras κ . Por tanto, los ratones transgénicos que comprenden un locus de cadena ligera λ humana deben poder producir un repertorio de anticuerpos humanos de una magnitud próxima a o sustancialmente igual que la que se encuentra en seres humanos.

YAC que comprenden loci de cadena ligera λ humana y células huésped

- Se da a conocer en el presente documento un YAC que comprende un locus de cadena ligera λ humana o una parte del mismo. En general, los YAC comprenden un centrómero, orígenes de replicación, telómeros y el ADN de interés de levadura. Pueden usarse diversos centrómeros o telómeros, particularmente los centrómeros de los cromosomas 4 y 5 de levadura. En general, el YAC tiene un marcador seleccionable que permite la selección o el examen de células en las que se ha incorporado el YAC. En un aspecto, el gen de HPRT, más particularmente HPRT humana, se usa como marcador seleccionable porque permite una selección eficaz de células ES deficientes en HPRT que portan el YAC. Otros marcadores seleccionables o examinables conocidos que pueden usarse incluyen el gen de resistencia a higomicina, el gen de resistencia a neomicina, fl-gal y GPT.
- Puede obtenerse un YAC que comprende la totalidad o una parte del locus de cadena ligera λ humana mediante cualquier método conocido en la técnica siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva. El YAC puede aislarse mediante el examen de una biblioteca de YAC existente, tal como las disponibles a partir del Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (C. E. P. H.), París, Francia; Universidad de Washington, St. Louis, MO; u otras fuentes institucionales o comerciales. Alternativamente, el YAC puede prepararse fácilmente mediante técnicas bien conocidas en la técnica o tal como se describe en el presente documento. La secuencia genómica del locus de cadena ligera λ humana se conoce y pueden aislarse partes de la misma a partir de ADN genómico humano usando métodos tales como PCR, digestión de restricción y posterior aislamiento, fragmentación mecánica y posterior aislamiento, o cualquier otro método conocido en la técnica. Un método a modo de ejemplo para preparar YAC que contienen un inserto de ácido nucleico de interés puede encontrarse en Birren *et al.*, Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. Véase vol. 3, capítulo 5.
- Un locus de cadena ligera λ humana o una parte del mismo puede estar contenido dentro de uno o más clones de YAC. Cuando el locus de cadena ligera λ humana se propaga a lo largo de múltiples clones de YAC, puede reconstituirse un locus de cadena ligera λ humana intacto mediante recombinación homóloga entre los YAC con regiones solapantes de homología. Véanse los ejemplos más adelante. Alternativamente, puede usarse sólo una parte del locus de cadena ligera λ humana.
- El YAC puede comprender un locus λ humano de entre 500 kb y 0,9 Mb o puede comprender un locus λ humano de entre 600 kb y 0,9 Mb, de entre 700 kb y 0,9 Mb o de entre 800 kb y 0,9 Mb. El YAC puede comprender un locus λ humano que es de aproximadamente 0,9 Mb. El YAC también puede comprender un locus de cadena ligera λ que es sustancialmente similar al locus de cadena ligera λ humano.
- Pueden usarse varios tipos diferentes de células huésped en la práctica de esta divulgación. La célula huésped puede tener la capacidad de integrar el ADN de YAC en un cromosoma. La célula huésped puede tener la capacidad de participar en la formación de un animal transgénico no humano. La célula huésped puede ser una célula ES o un ovocito. Tales células ES normalmente se expanden en cultivo, permanecen viables, proporcionan un medio para la selección después de la incorporación de ADN foráneo y son competentes para repoblar el huésped, incluyendo la línea germinal. Las células ES descritas en el presente documento pueden derivarse de cualquier huésped no humano, pero preferiblemente es una célula aviar o de mamífero. Los roedores, incluyendo ratas y ratones, pueden proporcionar las células ES para la incorporación de un locus de cadena ligera λ humana. Las células ES también pueden derivarse de animales de laboratorio comunes, o animales domésticos, que incluyen conejos, cerdos, hámsteres, caballos, perros, ovejas, cabras, ganado bovino, cobayas y aves tales como gallinas, pavos, etc.
- Las células ES pueden tener una o más mutaciones, por ejemplo, pueden carecer de un fenotipo particular o tienen un fenotipo dominante. De particular interés son las células ES que pueden seleccionarse usando el gen de HPRT, el gen de resistencia a neomicina, el gen de resistencia a higomicina, fl-gal y/o GPT.
- La célula ES también puede tener loci de cadena pesada, cadena ligera κ y/o de cadena ligera λ endógena sustancialmente inactivados. La célula ES puede comprender tanto un locus de cadena pesada endógena sustancialmente inactivado como un locus de cadena ligera κ o puede comprender un locus de cadena ligera λ endógena sustancialmente inactivado.

Métodos de producción de células y animales no humanos

- También se describen en el presente documento métodos para introducir un locus de cadena ligera λ humana en células y animales huésped no humanos. Puede introducirse un YAC que porta el locus de cadena ligera λ humana o una parte del mismo en una célula huésped, por ejemplo, una célula ES o un ovocito mediante una variedad de métodos, incluyendo fusión de esferoplasto de levadura:célula ES, microinyección y lipofección. Véase, por ejemplo, el ejemplo 3 y Birren *et al.*, citado anteriormente, págs. 546-550. Se describe en el presente documento un método en el que una célula de levadura que comprende el YAC de interés se fusiona con una célula ES. Después de la introducción del YAC en la célula ES, las células se seleccionan o examinan para determinar la incorporación del YAC en el genoma de la célula usando métodos conocidos en la técnica siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva.

Por tanto, se describe en el presente documento una célula ES no humana o la progenie de la misma, que comprende un locus de cadena ligera λ humana sustancialmente completo o una parte del mismo. La célula ES o la

progenie pueden comprender un locus de cadena ligera λ humana de línea germinal sustancialmente completo.

5 La célula ES puede comprender además una lesión genética en las regiones constantes y/o J de uno o más de los loci de inmunoglobulina endógena de la célula madre embrionaria no humana o la progenie de la misma. La lesión genética puede ser en una región J de cadena pesada de inmunoglobulina. La lesión genética puede ser en la región J de ambas copias del locus de cadena pesada de inmunoglobulina. La lesión genética puede ser en una
 10 copias del locus de cadena ligera κ endógena. La lesión genética puede ser en la región constante y/o J de una o ambas copias del locus de cadena ligera λ endógena. La lesión genética puede comprender una delección de uno o más de los loci de cadena pesada, cadena ligera κ o cadena ligera λ endógena. Además, la lesión genética puede comprender el reemplazo de al menos una parte de los loci de cadena pesada, cadena ligera κ o cadena ligera λ endógena por los loci de cadena pesada, cadena ligera κ y/o cadena ligera λ humana sustancialmente completos correspondientes mediante recombinación homóloga.

15 La célula ES no humana o la progenie de la misma puede comprender además lesiones genéticas en ambas copias endógenas de un locus de inmunoglobulina de la célula ES no humana o la progenie de la misma, en la que las lesiones genéticas dan como resultado la incapacidad de ambas copias del locus de inmunoglobulina endógena para reorganizarse.

20 La lesión genética puede ser una inserción de una secuencia transgénica. La lesión genética puede resultar de la perturbación dirigida de uno o más de los loci de inmunoglobulina endógena por un gen marcador seleccionable. El gen marcador seleccionable puede ser el gen de HPRT, el gen de resistencia a neomicina, el gen de resistencia a higromicina, fl-gal o GPT. La célula madre o la progenie de la misma pueden ser homocigotas para la lesión genética.

Métodos para producir animales transgénicos no humanos que comprenden una cadena ligera λ humana

25 Después de la selección y el examen, la célula ES puede usarse para crear animales transgénicos no humanos de la invención. Véase el ejemplo 3 más adelante. Los animales huésped pueden ser un animal transgénico no humano seleccionado de ratones, ratas, conejos, cerdos, hámsteres, caballos, perros, ovejas, cabras, ganado bovino o cobayas. En la presente invención, el animal huésped es un ratón. Los animales huésped pueden ser animales transgénicos no humanos que contienen una o más lesiones genéticas en loci de inmunoglobulina endógena de los ratones. Los animales huésped pueden ser ratones de la línea XenomouseTM.

Se describe en el presente documento un método para producir un animal transgénico no humano, que comprende:

- 30 a. combinar en condiciones de fusión (a) esferoplastos de levadura que tienen incorporado un YAC que comprende un locus de cadena ligera λ humana sustancialmente completo o una parte del mismo y un marcador seleccionable con (b) células ES de un animal huésped;
- b. seleccionar las células ES que tienen incorporado el marcador seleccionable y seleccionar de ese modo el locus de cadena ligera λ humana o una parte del mismo, mediante lo cual el locus de cadena ligera λ humana o una parte
 35 del mismo y el marcador seleccionable se incorporan en el genoma de las células madre embrionarias;
- c. transferir las células ES seleccionadas a un blastocisto del huésped e implantar el blastocisto en un receptor animal no humano con embarazo simulado;
- d. permitir que el blastocisto se desarrolle a término para producir un animal no humano quimérico que porta el locus de cadena ligera λ humana o una parte del mismo; y
- 40 e. aparear el animal quimérico no humano con un animal de la misma especie para producir el animal transgénico no humano, en el que el animal transgénico no humano ha heredado el locus de cadena ligera λ humana o una parte del mismo del animal quimérico.

45 El locus de cadena ligera λ humana puede ser una secuencia de línea germinal de longitud sustancialmente completa. El marcador seleccionable puede ser el gen de HPRT, el gen de resistencia a neomicina, el gen de resistencia a higromicina, fl-gal o GPT. La célula ES puede ser deficiente en la expresión de cadena pesada y ligera λ y/o κ de inmunoglobulina endógena. La célula ES puede comprender además un locus de cadena pesada humana y un locus de cadena ligera κ humana. El método puede comprender además aparear el animal transgénico no humano heterocigoto de la etapa (e) con otro animal transgénico no humano heterocigoto para el locus de cadena ligera λ humana para producir un animal transgénico no humano homocigoto para el locus de cadena ligera λ
 50 humana.

El animal transgénico no humano heterocigoto para el locus de cadena ligera λ humana puede aparearse con un animal transgénico no humano que tiene loci de cadena pesada y cadena ligera κ de inmunoglobulina endógena sustancialmente inactivados y, opcionalmente, loci de cadena ligera λ humana endógena sustancialmente inactivados, y animal transgénico no humano que comprende loci de cadena pesada humana y cadena ligera κ

humana. La cadena ligera κ humana y la cadena ligera λ humana pueden comprender cada una genes de V, J y región constante y la cadena pesada humana comprende genes de V, J, D y región constante. Se seleccionan animales transgénicos no humanos heterocigotos para la presencia de loci de cadena ligera λ humana, de cadena pesada y cadena ligera κ humana y se aparean entre sí. Luego se seleccionan animales transgénicos no humanos homocigotos para la presencia de la expresión de cadena ligera λ , cadena pesada y cadena ligera κ humana.

La progenie del animal transgénico no humano pueden ser uno o más animales de una generación F_1 , F_2 , F_3 , F_4 , F_5 , F_6 , F_7 , F_8 , F_9 o F_{10} . Una ventaja particular de Xenomouse es que es genéticamente estable, es decir, los genes de inmunoglobulina humana se mantienen en los ratones sin delecionarse para las generaciones. Las líneas celulares u otros productos producidos a partir de los ratones también son estables. Al menos el 95% de una población de animales transgénicos no humanos de la divulgación puede ser genéticamente estable durante al menos tres generaciones, cinco generaciones, siete generaciones o diez generaciones. Al menos el 98% o el 100% de la población puede ser genéticamente estable.

El método descrito anteriormente puede usarse para producir un animal transgénico que es una rata, un perro, un mono, una cabra, un cerdo, una vaca, un hámster, un conejo, un caballo, una oveja, una cobaya o un ave. En general, el método implica introducir un YAC en una célula ES de la especie de interés, por ejemplo, mediante fusión de esferoplastos, introducir las células ES en un blastocisto y producir un animal quimérico no humano, y luego realizar los apareamientos apropiados para obtener animales transgénicos no humanos que comprenden un locus de cadena ligera λ humana. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.994.619.

Animales transgénicos no humanos que comprenden un locus de cadena ligera λ humana

Animales huésped no humanos que tienen incorporado un locus de cadena ligera λ humana proporcionan las enzimas y otros factores necesarios implicados para producir anticuerpos funcionales. Por tanto, esas enzimas y otros factores asociados con la reorganización de línea germinal, corte y empalme, mutación somática, y similares funcionarán en el huésped para producir anticuerpos completamente transgénicos en ausencia sustancial de anticuerpos endógenos.

Por tanto, se describen en el presente documento animales quiméricos y transgénicos no humanos que comprenden loci de cadena ligera λ humana que pueden expresar cadenas ligeras λ humanas. Un animal transgénico no humano puede comprender un locus de cadena ligera λ humana incorporado de manera estable en el animal no humano, lo que permite la transmisión de la línea germinal. Los animales no humanos pueden ser heterocigotos u homocigotos para el locus humano, pero preferiblemente son homocigotos. Estos animales pueden usarse para una amplia variedad de fines, incluyendo producción de anticuerpos completamente humanos y fragmentos de los mismos, selección de fármacos, terapia génica, modelos animales de enfermedades de seres humanos y modelos animales de regulación genética.

Se describe en el presente documento un animal transgénico no humano, que comprende un locus de cadena ligera λ humana sustancialmente completo que comprende genes de V, J y región constante. También se describe en el presente documento un animal transgénico no humano que comprende entre 500 kb y 0,9 Mb del locus de cadena ligera λ humana. El animal transgénico no humano puede comprender un locus de cadena ligera λ humana de entre 600 kb y 0,9 Mb, entre 700 kb y 0,9 Mb o entre 800 kb y 0,9 Mb. El animal transgénico no humano puede comprender un locus de cadena ligera λ humana de aproximadamente 0,9 Mb.

El animal no humano que comprende el locus de cadena ligera λ humana puede ser heterocigoto u homocigoto para un locus de cadena pesada endógena sustancialmente inactivado. El animal no humano puede ser heterocigoto u homocigoto para un locus de cadena ligera κ endógena sustancialmente inactivado. El animal no humano puede ser heterocigoto u homocigoto para un locus de cadena ligera λ endógena sustancialmente inactivado. El animal no humano puede comprender además un locus de cadena pesada de inmunoglobulina humana que comprende genes de V, D, J y región constante. El animal no humano puede comprender además un locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina transgénica que comprende genes de V, J y región constante.

Se describen además en el presente documento animales transgénicos no humanos, que comprenden loci de cadena pesada y cadena ligera κ de inmunoglobulina endógena sustancialmente inactivados y, opcionalmente, un locus de cadena ligera λ endógena sustancialmente inactivado; un locus de cadena pesada de inmunoglobulina humana que comprende genes de V, D, J y región constante; un locus de cadena ligera κ humana que comprende genes de V, J y región constante; y un locus de cadena ligera λ humana que comprende genes de V, J y región constante. El animal transgénico no humano puede comprender un locus de cadena ligera λ humana de entre 500 kb y aproximadamente 0,9 Mb del locus de cadena ligera λ humana. El animal transgénico no humano puede comprender un locus de cadena ligera λ humana de entre 600 kb y 0,9 Mb, entre 700 kb y 0,9 Mb o entre 800 kb y 0,9 Mb. El locus de cadena ligera λ humana en el animal transgénico no humano puede comprender sustancialmente la totalidad del locus de cadena ligera λ humana de longitud completa.

El animal transgénico no humano puede seleccionar como diana el locus de cadena ligera λ humana para recombinación VJ y puede tener la capacidad de expresar el locus de cadena ligera λ humana. El locus de cadena

pesada humana puede tener la capacidad de expresarse en el animal transgénico no humano. El locus de cadena ligera κ humana puede tener la capacidad de expresarse en el animal transgénico no humano.

5 La inactivación sustancial del locus de cadena pesada y/o locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina endógena puede ser el resultado de introducir una lesión genética en el locus. La inactivación sustancial de los loci de cadena pesada de inmunoglobulina endógena puede comprender una lesión genética en la región J de los loci de cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina endógena. La inactivación sustancial de los loci de cadena ligera endógena puede comprender una lesión genética en la región constante y/o J de los loci de cadena ligera endógena.

10 El animal transgénico no humano puede ser un ratón, una rata, un perro, un mono, una cabra, un cerdo, una vaca, un hámster, un conejo, un caballo, una oveja, una cobaya o un ave. El animal transgénico puede ser un ratón o una rata. En la presente invención, el animal transgénico es un ratón.

15 Aunque se introduce un locus de cadena ligera λ humana en un animal transgénico no humano, un experto habitual en la técnica siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva también podría introducir un locus de cadena ligera λ de una especie distinta a la humana en un animal transgénico no humano. Los ejemplos de especies deseables incluyen simio, mono, otros primates no humanos, animales de compañía, tales como perros y gatos, y animales útiles en agricultura, tales como ganado bovino, caballos, ovejas, cabras y cerdos.

20 Los animales no humanos que comprenden loci de cadena pesada de inmunoglobulina sustancialmente inactivados no tienen la capacidad de generar receptores de inmunoglobulina de linfocitos B, lo que da como resultado un bloqueo temprano en el desarrollo del linaje de linfocitos B. Los loci de inmunoglobulina transgénica complementan esta deficiencia, permitiendo el desarrollo de células B linfocíticas o la progenie de las mismas. Por tanto, los animales transgénicos no humanos descritos en el presente documento que comprenden loci de inmunoglobulina sustancialmente inactivados pueden comprender además una población de linfocitos B primaria o secundaria reconstituida en la que el nivel de la población es del 5-20% del de un animal de tipo silvestre, el 20-40% del de un animal de tipo silvestre, el 40-60% del de un animal de tipo silvestre, el 60-80% del de un animal de tipo silvestre, el 80-100% del de un animal de tipo silvestre, o el 100-200% del de un animal de tipo silvestre.

25 Producción de anticuerpos y células productoras de anticuerpos

30 Pueden usarse animales transgénicos no humanos de la divulgación, o linfocitos B derivados de los mismos, para producir anticuerpos monoclonales y/o policlonales aislados que comprenden una cadena ligera λ humana. Además, pueden usarse linfocitos B derivados de animales no humanos de la divulgación para crear líneas celulares que producen anticuerpos monoclonales. Los linfocitos B pueden immortalizarse. La immortalización puede lograrse mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a: fusión a células de mieloma para producir hibridomas; transfección con oncogenes; infección con virus oncogénicos; e inactivación de genes supresores de tumores. Pueden hacerse crecer las células immortalizadas en cultivo continuo para la producción de anticuerpos o pueden introducirse en el peritoneo de un huésped compatible para la producción de ascitis que contiene los anticuerpos de interés.

35 Alternativamente, pueden aislarse genes reorganizados que codifican para la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo de interés de células primarias derivadas de un ratón transgénico inmunizado de la invención o de células immortalizadas derivadas de tales células primarias y expresarse de manera recombinante. Los genes de anticuerpo reorganizados pueden someterse a transcripción inversa a partir de ARNm apropiados para producir ADNc. Pueden insertarse moléculas de ácido nucleico que codifican para cadenas pesadas y ligeras en sistema de expresión contenidos en vectores y transfectarse en células huésped recombinantes convencionales. Tal como se describe a continuación, puede usarse una variedad de tales células huésped, siendo el criterio principal la compatibilidad con las secuencias de control de la expresión.

45 La producción del anticuerpo se emprende luego cultivando el huésped recombinante modificado en condiciones apropiadas para el crecimiento de las células huésped y la expresión de las secuencias codificantes. Luego se recuperan los anticuerpos del cultivo. Preferiblemente, el sistema de expresión está diseñado para incluir péptidos señal de modo que los anticuerpos expresados se secretan en el medio de cultivo. Sin embargo, la producción intracelular también es posible.

50 En un aspecto, un ratón transgénico de la invención se inmuniza con un antígeno de interés, se aíslan células primarias, por ejemplo, células de bazo o sangre periférica, de un ratón transgénico inmunizado y se identifican células individuales que producen anticuerpos específicos para el antígeno deseado. Se aísla ARNm poliadenilado de cada célula individual y se realiza la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) usando cebadores sentido que se hibridan con secuencias de región variable, por ejemplo, cebadores degenerados que reconocen la mayor parte o la totalidad de regiones FR1 de genes de V_H y V_λ humanos, y cebadores antisentido que se hibridan con secuencias de región constante o de unión. Luego se clonan los ADNc de V_H y V_λ y se expresan en cualquier célula huésped adecuada, por ejemplo, una célula de mieloma, como anticuerpos quiméricos con regiones constantes de inmunoglobulina respectivas, tales como dominios constantes λ y de cadena pesada. Véase Babcock, J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-48, 1996.

Pueden aprovecharse técnicas de presentación en fago para proporcionar bibliotecas que contienen un repertorio de anticuerpos con afinidades variables por un antígeno deseado. Para la producción de tales repertorios, es innecesario inmortalizar las células B del ratón inmunizado. Más bien, pueden usarse las células B primarias directamente como fuente de ADN. La mezcla de ADNc obtenida a partir de las células B, por ejemplo, derivadas de bazos, se usa para preparar una biblioteca de expresión, por ejemplo, una biblioteca de presentación en fago transfectada en *E. coli*. Se someten a prueba las células resultantes para determinar la inmunorreactividad con el antígeno deseado. Se describen técnicas para la identificación de anticuerpos humanos de alta afinidad de tales bibliotecas en Griffiths *et al*, EMBO J., 13: 3245-3260 (1994); Nissim *et al.*, *ibid.*, págs. 692-698 y en Griffiths *et al.*, *ibid.*, 12: 725-734. En última instancia, se identifican clones de la biblioteca que producen afinidades de unión de una magnitud deseada para el antígeno y el ADN que codifica para el producto responsable de tal unión se recupera y manipula para la expresión recombinante convencional. También pueden construirse bibliotecas de presentación en fago usando secuencias de nucleótidos manipuladas previamente y examinarse de un modo similar. En general, los ADNc que codifican para cadenas pesadas y ligeras se suministran independientemente o se unen para formar análogos de Fv para la producción en la biblioteca de fagos.

Luego se examina la biblioteca de fagos para detectar los anticuerpos con la mayor afinidad por el antígeno y se recupera el material genético del clon apropiado. Tandas adicionales de examen pueden aumentar la afinidad del anticuerpo original aislado.

Se describe en el presente documento un método para producir antisueros humanos policlonales y anticuerpos policlonales aislados que comprenden una cadena ligera λ humana. El método comprende las etapas de inmunizar un ratón transgénico de la invención con un antígeno de interés, permitir que el ratón transgénico genere una respuesta inmunitaria frente al antígeno, aislar el suero del ratón para obtener un antisuero humano policlonal, y, opcionalmente, aislar los anticuerpos policlonales del antisuero. Pueden obtenerse antisueros aislados y anticuerpos policlonales aislados usando técnicas bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, citado anteriormente. Los anticuerpos pueden aislarse usando, por ejemplo, una columna de afinidad que tiene un resto de unión a Fc tal como proteína A o proteína G. Pueden producirse además fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ usando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, citado anteriormente.

Se describen en el presente documento métodos para producir una línea celular que produce un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento del mismo dirigido contra un antígeno específico, que comprenden:

- a. inmunizar los animales transgénicos no humanos descritos en el presente documento con un antígeno de interés;
- b. permitir que el animal transgénico no humano genere una respuesta inmunitaria frente al antígeno;
- c. aislar linfocitos B del animal transgénico no humano;
- d. inmortalizar los linfocitos B;
- e. crear poblaciones monoclonales individuales de los linfocitos B inmortalizados; y
- f. examinar los linfocitos B inmortalizados para identificar un anticuerpo dirigido contra el antígeno.

En otro aspecto, la etapa de inmortalización se logra fusionando el linfocito B con una línea celular de mieloma apropiada, tal como la línea NSO-bcl2 [S. Ray, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 5548-5551 (1994)] o las células P3-X63-Ag8.653, disponibles de la ATCC, para producir una línea celular de hibridoma. En otra realización preferida, se examinan los linfocitos B inmortalizados sometiendo a ensayo el sobrenadante producido por las células para determinar la presencia del anticuerpo deseado. La etapa de ensayo es normalmente un ELISA o un radioinmunoensayo (RIA), aunque puede usarse cualquier método de examen. Se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal aislado producido mediante los métodos descritos en el presente documento.

En otro aspecto, se describe en el presente documento una célula primaria o la progenie de la misma derivada de los animales transgénicos no humanos descritos en el presente documento. También se describe en el presente documento una célula inmortalizada o la progenie de la misma derivada de los animales transgénicos no humanos descritos en el presente documento. La célula inmortalizada o la progenie de la misma puede tener su origen en linfocitos B. La célula inmortalizada puede ser un hibridoma. La célula inmortalizada puede derivarse de una célula de ratón, una célula de rata, una célula de perro, una célula de mono, una célula de cabra, una célula de cerdo, una célula de vaca, una célula de hámster, una célula de conejo, una célula de caballo, una célula de oveja, una célula de cobaya o una célula de ave.

Se da a conocer en el presente documento un repertorio de anticuerpos producidos por los animales transgénicos no humanos descritos anteriormente que comprenden entre 7×10^5 y 1×10^{11} especies de anticuerpos diferentes. El repertorio de anticuerpos puede comprender entre 1×10^5 y 1×10^7 especies de anticuerpos diferentes. El repertorio de anticuerpos puede comprender entre 1×10^7 y 1×10^9 especies de anticuerpos diferentes o entre 1×10^9 y 1×10^{11} especies de anticuerpos diferentes.

Se describe en el presente documento un anticuerpo derivado de los animales transgénicos no humanos descritos en el presente documento, en el que el anticuerpo tiene una constante de disociación menor de 1×10^{-7} M. La constante de disociación puede ser menor de 1×10^{-8} M, menor de 1×10^{-9} M, de 1×10^{-10} M, menor de 1×10^{-11} M, o menor de 1×10^{-12} M o de 1×10^{-13} . En general, el anticuerpo tendrá una constante de disociación de entre 1×10^{-7} y 1×10^{-12} M.

Se predice que la especificidad de anticuerpos (es decir, la capacidad para generar anticuerpos frente a un amplio espectro de antígenos y en efecto frente a un amplio espectro de epítomos independientes en los mismos) depende de los genes de regiones variables en los loci de cadena pesada (V_H), cadena ligera κ (V_κ) y cadena ligera λ (V_λ) humana. El genoma de cadena pesada humana incluye aproximadamente 95 genes de V_H de los que 41 son genes funcionales que codifican para regiones variables de la cadena pesada humana de moléculas de inmunoglobulina. El locus de cadena ligera κ humana incluye aproximadamente 40 genes de V_κ de los que 25 son funcionales y el locus de cadena ligera λ humana comprende aproximadamente 69 genes de V_λ de los que 30 son funcionales y se ha encontrado que se usan en transcritos de $Ig\lambda$ humana reorganizados. Los loci de cadena pesada y cadena ligera humana pueden comprender además varias regiones J funcionales diferentes y, para la cadena pesada humana, varias regiones D funcionales diferentes. Véase la tabla 1.

Se describen según la presente divulgación ratones transgénicos que comprenden la totalidad o una parte del locus de cadena ligera λ humana, en los que una parte es mayor del 60%, mayor del 70% o el 80%, o mayor del 90% o el 95%. El locus λ humano puede incluir al menos dos o las tres agrupaciones de genes de λ . El locus λ puede incluir genes de las familias de genes de V_λ I, IV-VII, IX y X o puede incluir genes de las diez familias de genes de V_λ .

Se describen además en el presente documento ratones transgénicos que tienen una parte sustancial de un locus de cadena pesada humana. El animal transgénico puede comprender un locus de cadena ligera κ humana. Por tanto, más del 10% de los genes de V_H y V_κ humanos pueden estar presentes o más de aproximadamente el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, o incluso el 70% o más de los genes de V_H y V_κ pueden estar presentes. Pueden usarse constructos que incluyen 32 genes de la región proximal del locus de cadena ligera V_κ , 66 genes en el locus de cadena pesada V_H y 69 genes del locus de cadena ligera V_λ . Tal como se apreciará, pueden incluirse genes o bien de manera secuencial, es decir, en el orden en que se encuentran en el genoma humano, o bien fuera de secuencia, es decir, en un orden distinto al que se encuentran en el genoma humano, o una combinación de los mismos. Por tanto, a modo de ejemplo, puede usarse una parte totalmente secuencial de cualquiera de los loci de V_H , V_κ y V_λ , o diversos genes de V en los loci de V_H , V_κ y V_λ pueden saltarse mientras se mantiene una organización secuencial global, o pueden reordenarse genes de V dentro de los loci de V_H , V_κ y V_λ . Todo el locus insertado puede proporcionarse en la configuración sustancialmente de línea germinal tal como se encuentra en seres humanos. La inclusión de una serie diversa de genes de los loci de V_H , V_κ y V_λ conduce a una especificidad de anticuerpo potenciada y, en última instancia, a afinidades de anticuerpo potenciadas.

Además, tales ratones pueden incluir toda la región D_H , toda la región J_H , la región constante mu humana, y pueden dotarse adicionalmente de otras regiones constantes humanas para la codificación y generación de isotipos adicionales de anticuerpos. Tales isotipos pueden incluir genes que codifican para $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4, \alpha, \epsilon$ y δ y otros genes que codifican para región constante con secuencias de cambio y reguladoras apropiadas. Tal como se apreciará, y tal como se comenta con más detalle a continuación, una variedad de secuencias de cambio y reguladoras pueden utilizarse apropiadamente en relación con cualquier selección de región constante particular.

La tabla 1 indica la diversidad de combinaciones de anticuerpos que son posibles en seres humanos, basándose estrictamente en la unión V-D-J al azar y combinación con cadenas ligeras κ , sin consideración de eventos de N-adición, deleciones o mutación somática. Basándose en estas consideraciones, hay más de 1×10^6 posibles combinaciones de anticuerpos en seres humanos, de cualquier isotipo particular.

TABLA 1

Región	Cadena pesada	Cadena ligera κ	Cadena ligera λ
"V" variable funcional	~41	25	30
"D" diversidad funcional	≥ 23	--	--
"J" de unión	6	5	4
Combinaciones ($V \times D \times J$)	5.658	125	120
Combinaciones totales (combinaciones de HC x combinaciones de LC)	$1,39 \times 10^6$		

TABLA 2 (genes de V en XM-KL)

Región	Cadena pesada	Cadena ligera κ	Cadena ligera λ
"V" variable funcional	34	18	30

"D" de diversidad funcional	23	--	--
"J" de unión	6	5	4
Combinaciones (VxDxJ)	4.692	90	120
Combinaciones totales (combinaciones de HC x combinaciones de LC)	0,99 x 10 ⁶		

El cálculo proporcionado en la tabla 1 no tiene en cuenta eventos de N-adición o mutación somática. Por tanto, se apreciará que los ratones según la invención ofrecen una diversidad de anticuerpos sustancial.

5 El aumento de la variedad y el número de regiones variables incluyendo las regiones variables del locus de cadena ligera λ humana, aumenta tanto la diversidad de anticuerpos como la especificidad de anticuerpo. Por tanto, los ratones transgénicos según esta invención pueden generar una respuesta inmunitaria frente a una amplia serie de antígenos incluyendo una amplia serie de epítomos en antígenos o inmunógenos individuales. Los anticuerpos producidos según la presente invención también presentan afinidades potenciadas.

Ácidos nucleicos, vectores, células huésped y métodos recombinantes de producción de anticuerpos

10 Se da a conocer en el presente documento una molécula de ácido nucleico aislada de un animal transgénico no humano, en la que las moléculas de ácido nucleico aisladas codifican para un polipéptido de cadena ligera λ humana o una parte de unión a antígeno del mismo. La molécula de ácido nucleico puede aislarse de un linfocito B o la progenie del mismo que produce la cadena ligera λ humana. La progenie del linfocito B puede ser un hibridoma. Las moléculas de ácido nucleico aisladas pueden comprender la secuencia que codifica para entre de una a tres de las regiones CDR del anticuerpo humano. El ácido nucleico aislado puede codificar para un polipéptido de cadena
15 ligera λ humana o una parte de unión a antígeno del mismo que se une a un antígeno de interés específico.

También se describen en el presente documento vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento o un fragmento de las mismas. El vector puede comprender además secuencias de control de la expresión operativamente unidas a la molécula de ácido nucleico. También se describe en el presente documento una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico aislada de un animal transgénico no humano que codifica para una cadena ligera λ humana o una parte de unión a antígeno de la misma que se une que específicamente a un antígeno de interés; o un vector que comprende la molécula de ácido nucleico.
20

Se describen además en el presente documento células huésped aisladas que comprenden una molécula de ácido nucleico que se aisló de un animal transgénico no humano y que codifica para una cadena pesada humana o la parte de unión a antígeno de la misma y una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para una cadena ligera λ humana o una parte de unión a antígeno de la misma que se une específicamente a un antígeno de interés, o un vector o vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico.
25

Las células huésped pueden ser células de hibridoma, células bacterianas, células de levadura, células de insecto, células de anfibio y células de mamífero. Las células huésped pueden ser células de ratón, células de rata, células de perro, células de mono, células de cabra, células de cerdo, células de vaca, células de hámster, células de conejo, células de caballo, células de oveja, células de cobaya o células de ave. Las células de mamífero pueden ser células HeLa, células NIH 3T3, células CHO, células 293, células BHK, células VERO, células CV-1, células NS/O o células COS.
30

Se dan a conocer en el presente documento métodos de producción de manera recombinante de una cadena ligera λ humana o una parte de unión a antígeno de la misma, o tanto la cadena ligera λ humana como una cadena pesada humana o una parte de unión a antígeno de la misma, que se identificó de un animal transgénico no humano y se une específicamente a un antígeno de interés, que comprende la etapa de cultivar las células huésped descritas en el presente documento en condiciones en las que se expresan las moléculas de ácido nucleico.
35

Se dan a conocer en el presente documento animales transgénicos no humanos que comprenden las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento, en los que el animal transgénico no humano expresa la molécula de ácido nucleico.
40

Se dan a conocer en el presente documento animales transgénicos no humanos que comprenden una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para una cadena pesada de inmunoglobulina o una parte de unión a antígeno de la misma y una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para una cadena ligera λ o una parte de unión a antígeno de la misma de un anticuerpo humano que se une específicamente a un antígeno de interés, en los que el animal expresa las moléculas de ácido nucleico. Los animales transgénicos no humanos descritos en el presente documento pueden ser ratones, ratas, perros, monos, cabras, cerdos, vacas, hámsteres, conejos, caballos, ovejas, cobayas o aves. El anticuerpo humano que resulta de la expresión de las moléculas de ácido nucleico aisladas o una parte de las mismas puede expresarse en la superficie de células derivadas de linfocitos B del animal o la progenie de los mismos. El anticuerpo humano que resulta de la expresión de las moléculas de ácido nucleico aisladas o una parte de las mismas puede secretarse en la linfa, sangre, leche, saliva o ascitis del animal no humano.
45
50

Se ofrecen los siguientes ejemplos a modo de ilustración y no a modo de limitación. Los medios y métodos generales usados en el presente documento se describen en Birren *et al.*, *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. Los medios y métodos generales para la clonación, el aislamiento, la manipulación y el análisis de YAC se describen en Birren *et al.*, citado anteriormente, volumen 3, capítulo 5 y apéndices 1-5.

EJEMPLO 1: Identificación de YAC que comprenden secuencias de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana

Se obtuvieron YAC que comprenden partes del locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana y sondas para todos los V_λ y C_λ del Medical Research Center (MRC, Edimburgo, R.U.). Se analizaron inicialmente los L1 YAC y L2 YAC para (1) confirmar la presencia de los loci λ de inmunoglobulina humana correctos; (2) evaluar la estabilidad de las secuencias de gen de λ de inmunoglobulina; (3) determinar la orientación de las secuencias de gen de λ de inmunoglobulina; y (4) confirmar la presencia de los marcadores de levadura en los YAC.

Se sembraron en franjas levaduras que contenían los YAC para obtener colonias individuales sobre placas de agar SC-URA (véase Birren *et al.*, citado anteriormente, vol. 3, págs. 586-87) y se incubaron durante de tres a cuatro días a 30°C hasta que aparecieron colonias. Se inocularon colonias individuales en 5 ml de medios líquidos SC-URA y se hicieron crecer hasta saturación. Se produjeron preparaciones de ADN y disoluciones madre para congelador (tapones de levadura). Véase Birren *et al.*, citado anteriormente, vol. 3, págs. 391-395.

Para confirmar la presencia e integridad del ADN de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana, se sometió ADN de L1 y L2 YAC no digerido a electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) usando un aparato CHEF-DRII (Bio-Rad, Hercules, CA). Se sometió a electroforesis el ADN a través de geles de agarosa al 0,8%/0,5X TBE a 200 voltios y se comparó con un marcador de peso molecular de ADN de λ multimerizado usado como marcador de tamaño (New England Biolabs n.º de cat. 340). Se expusieron los geles a pulsos alternos de 60 segundos durante 15 horas, seguido por pulsos de 90 segundos durante 10 horas. Después de la electroforesis, se tiñeron los geles con EtBr, se fotografiaron, se despurinizaron en HCl 0,2 N y se desnaturalizaron con NaOH.

Se transfirió el ADN de YAC incluido en los geles a una membrana de nailon (Genescreen, NEN, Boston, Massachusetts) y se examinó con sonda la membrana usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1989) para determinar el tamaño de L1 y L2 YAC. La sonda era un gen de TRP marcado con ^{32}P , un fragmento de EcoRI/BamHI de 5,4 kb de pYAC4 (n.º de registro GenBank U01086) de los nucleótidos 6008 a 11454. El análisis de transferencia de tipo Southern reveló que L1 YAC era de aproximadamente 1 Mb y L2 YAC era de aproximadamente 450 kb. Además, se encontró que la secuencia de cadena ligera λ de inmunoglobulina en L1 YAC era estable (véase Birren *et al.*, citado anteriormente, vol. 3, págs. 586-87) durante 48 horas.

Tras el análisis de la estructura a gran escala del YAC, se analizaron moléculas de ADN de L1 y L2 YAC mediante digestión con EcoRI y transferencia de tipo Southern para confirmar la presencia de los genes de V_λ de línea germinal. Cuando se examinó con sonda ADN de L1 YAC con secuencias de V_λ obtenidas del Medical Research Council, se observaron bandas que concordaban con las predichas por la divulgación de Frippiat *et al.* *Hum. Mol. Genet.* 4: 987-991 (1995), confirmando que L1 YAC tenía la mayor parte de los genes de V_λ . También pueden generarse fácilmente sondas por un experto habitual en la técnica. Véanse, por ejemplo, Frippiat *et al.*, pág. 984, citado anteriormente, Kawasaki *et al.*, *Genome Res.* 7: 250-261 (1997); Williams *et al.*, *J. Mol. Biol.* 264: 220-232 (1996), págs. 226-229, que describen sondas derivadas de genes de V_λ . Sin embargo, L1 YAC contenía una reorganización en el extremo 3' en la unión V_λ/JC , tal como se reveló mediante la pérdida de un sitio Ascl, y la delección de genes de V_λ , 3a2, 2a1 4c, 3q y 3r mediante la convención de Williams *et al.*, *J. Mol. Biol.* 264: 220-232 (1996). Véase la figura 1.

Cuando se examinó con sonda L2 YAC con secuencias de V_λ , se detectaron 11 genes de V_λ del extremo 3' del locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana, incluyendo la región V_λ de línea germinal que se reorganizó en el extremo 3' de L1 YAC. También se encontró que L2 YAC contenía genes de J_λ y C_λ de línea germinal.

Se determinaron las orientaciones de brazos de L1 y L2 YAC mediante análisis por transferencia de tipo Southern. Se digirieron los ADN de L1 y L2 YAC con PmeI, NotI, Ascl, RsrII y MluI, se separó el ADN digerido mediante PFGE y luego se transfirió a una membrana de nailon, esencialmente tal como se describió anteriormente. Se examinaron con sonda las transferencias de manera secuencial con una secuencia de C_{λ_s} , el potenciador de cadena ligera λ de inmunoglobulina, una secuencia de gen de ampicilina y una secuencia de gen de URA3 y se comparó con una orientación de referencia. Véase Kawasaki *et al.*, *Genome Res.* 7: 250-261 (1997). Véase también Birren *et al.*, citado anteriormente, vol. 3, págs. 417-420. Las orientaciones de los brazos de L1 y L2 YAC eran opuestas entre sí y, por tanto, inapropiadas para la recombinación directa.

EJEMPLO 2: Construcción de un YAC que comprende un locus λ de inmunoglobulina de línea germinal humana de longitud completa

Para reconstruir todo el locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana de línea germinal en un único YAC,

tuvieron que recombinarse las secuencias de L2 YAC con las secuencias de L1 YAC en la orientación apropiada. Para la numeración de nucleótidos en el locus λ , se usó la secuencia de nucleótidos de Kawasaki completa, citada anteriormente. Se accedieron a los cóntigos de Kawasaki desde Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html) y se reensamblaron para dar una secuencia de ácido nucleico contigua de 1 Mb usando el software Vector NTI (InforMax, North Bethesda, MD). Esta secuencia cubre aproximadamente 125 kb en 5' del primer gen de V_λ e incluye hasta el potenciador en 3'.

Construcción de pYAC-5' y pYAC-3'

La primera etapa fue alterar L2 YAC para que comprendiese brazos acortados que eran apropiados para la recombinación con L1 YAC. Véase la figura 2. Se construyeron vectores de direccionamiento para ambos extremos 5' y 3' de L2 YAC (pYAC-5' y pYAC-3', respectivamente) con el fin de construir un YAC de 115 kb.

Para construir pYAC-5' para direccionar el extremo 5' de L2 YAC, se amplificó una parte de fragmento de 1.330 pb de ADN de L2 YAC mediante PCR y luego se clonó en el vector de clonación pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para la PCR, la secuencia de cebador 5' usada fue 5'-CGG ACC GCC TCA TTT GTT GTC AGA TCA TG-3' y contenía un sitio RsrII sintético para la clonación direccional. La secuencia de cebador 3' usada fue 5'-GGC CGG CCA GCA GAA TAC ATG TTA TCT T-3' y contenía un sitio FseI sintético para la clonación direccional.

Se construyeron los vectores de direccionamiento en pYAC4, un vector usado habitualmente para construir los YAC, véase Kuhn y Ludwig, Gene 141: 125-7 (1994), que contiene secuencias de ARS, CEN, telómero, URA y TRP. Para construir pYAC-5', se digirió pYAC4 con NotI y se ligó con ligadores hibridados, que tenían los sitios de restricción NotI (inactivado)-RsrII-NruI-Clal-FseI-NotI y la secuencia 5'-GGC CAT CGG ACC GTC GCG AAT CGA TGG CCG GCC GC-3', y 5'-GGC CGC GGC CGG CCA TCG ATT CGC GAC GGT CCG AT-3'. Esto produjo un vector derivado de pYAC4 que tenía un sitio de clonación múltiple que comprendía sitios RsrII, NruI, Clal, FseI y NotI. Se confirmó la orientación de los ligadores mediante un digesto NotI/SpeI. Luego se aisló el fragmento de homología en 5' L2 YAC como un casete RsrII/FseI de pCR2.1 y se ligó en los sitios RsrII y FseI del vector derivado de pYAC4. Se confirmó la orientación y el inserto de pYAC-5' mediante análisis de digestos de restricción.

Para construir pYAC-3', se amplificó un fragmento de 1.310 pb de L2 YAC 3' del potenciador en 3' mediante PCR y se clonó en el vector de clonación pCR2.1. Para la PCR, la secuencia de cebador 5' usada fue 5'-ACG CGT TGA TGA GCA ACC ACA GGC CT-3' y contenía un sitio MluI sintético para la clonación direccional. La secuencia de cebador 3' usada fue 5'-GGC CGG CCA GTC CAT CCT GGC TTC CTT C-3' y contenía un sitio FseI sintético para la clonación direccional. Se digirió pYAC4 con NotI y BamHI y se aisló el fragmento de vector de 5,5 kb que contenía las regiones de CEN, ARS y TRP y telómero mediante electroforesis en gel de agarosa y se ligó con ligadores hibridados que tenían los sitios de restricción NotI (inactivado)-BglIII-FseI-NruI-Clal-MluI-NotI-BamHI (inactivado) y las secuencias 5'-GGC CAT AGA TCT GGC CGG CCT CGC GAA TCG ATA CGC GTG C-3', y 5'-GAT CGC GGC CGC ACG CGT ATC GAT TCG CGA GGC CGG CCA GAT CTA T-3'. Luego se aisló el fragmento de homología en 3' L2 YAC como un casete NotI/BamHI y se ligó en los sitios NotI y BamHI del vector resultante. El plásmido intermedio resultante se denominó pYAC-3'int 2 y se confirmó mediante análisis de digestos de restricción. Debido a que el ligador se clonó de manera direccional, no se confirmó la orientación del ligador.

A diferencia de pYAC4, pYAC-3'int 2 carece del brazo de URA y es aproximadamente 5 kb más pequeño. Se digirió pYAC-3'int 2 con AatII y se clonó un ligador AatII-EcoRI-AatH en el sitio AatII. Para construir el vector de direccionamiento final pYAC-3', se digirió el plásmido resultante con EcoRI y XbaI, lo que elimina parte del gen de TRP, y se ligó con un casete EcoRI/XbaI de 4,5 kb que contenía el gen de LYS2 a partir del plásmido pLUS (n.º de ATCC 77407; Hermanson *et al.*, Nucleic Acids. Res. 19: 4943-4948 (1991)).

Construcción del clon 6-23

Se transformaron las levaduras que comprendían L2 YAC con los vectores de direccionamiento pYAC-5' y pYAC-3'. En primer lugar se incubaron las levaduras en medio líquido SC-URA durante 24 horas a 30°C, luego se incubaron en medio YPDA a 30°C durante 4-5 horas. Se transformaron las células simultáneamente con pYAC-3' linealizado con BamHI y el fragmento BamHI/FseI de 5 kb (brazo de URA) de pYAC-5' usando el procedimiento de transformación con LiAc. Véase Scheistl *et al.*, Curr. Genet. 16: 339-346 (1989). Se sembraron los transformantes en placas de agar SC-LYS, que se incuban a temperatura ambiente durante 4-5 días hasta que aparecen clones.

Se recogen los clones y se hacen crecer en placas SC-LYS y SC-TRP para identificar los YAC recombinantes, que son URA+, LYS+, TRP-. Véase la figura 2. Tras la recuperación de clones, se aisló el ADN de YAC y se sometió a prueba mediante PFGE para estimar el tamaño de L2 YAC modificado y mediante análisis por transferencia de tipo Southern usando las sondas de V_λ para confirmar la presencia de genes de C_λ (digestos de Hind III y BamHI), genes de V_λ (digestos de EcoRI) y el potenciador de λ (digestos de StuI). El L2 YAC acortado tiene aproximadamente 115 kb de tamaño y se designa como el clon 6-23. Véase la figura 2.

Análisis genético del clon 6-23

Se transfirió YAC 6-23 a la cepa YPH925 (MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 his3, n.º de ATCC 90834). Se hicieron crecer YPH925 y 6-23 YAC (MATa) durante la noche en placas YPDA a 30°C en zonas de aproximadamente 1 cm².

La mañana siguiente, se aparearon en una placa YPDA y se hicieron crecer a 30°C durante 6 horas. Se transfirió la mezcla resultante de haploides y diploides a placas SC-URA-LYS-HIS que proporcionan selección frente a ambos haploides, pero no a los diploides resultantes, debido a la complementariedad de los dos alelos HIS en las cepas haploides. Se incubaron las células durante 2 días a 30°C hasta que aparecieron colonias individuales. Se recogieron seis colonias independientes, se hicieron crecer en zonas de 1 cm² en placas YPDA, se incubaron durante la noche, se sembraron réplicas sobre placas de esporulación y se incubaron a temperatura ambiente durante 4-5 días. Véase, Birren *et al.*, citado anteriormente, vol. 3, págs. 495-501.

Se examinaron las células microscópicamente para determinar la esporulación, que fue superior al 5%. Se hicieron crecer las células esporuladas durante 4-5 días en placas SC-URA-LYS complementadas con canavanina y cicloheximida para impedir la formación de diploides y seleccionar las células que portan 6-23 YAC. Se recogieron colonias y se hicieron crecer en medios SC-LYS para análisis adicional.

Se verificó el tipo de apareamiento mediante un ensayo de PCR diseñado para identificar clones MATa. Véase Birren *et al.*, citado anteriormente, vol. 3, pág. 442. Las secuencias de cebador fueron 5'-AGT CAC ATC AAG ATC GTT ATG G-3'; 5'-GCA CGG AAT ATG GGA CTA CTT CG-3'; y 5'-ACT CCA CTT CAA GTA AGA GTT TG-3'. Véase, Huxley *et al.*, Hu771. *Mol. Genet.* 5: 563-569 (1990). Aproximadamente la mitad de los clones eran del tipo de apareamiento a y la mitad eran de un tipo de apareamiento a.

Para confirmar que los clones MATa retenían un 6-23 YAC intacto, se analizaron adicionalmente mediante PFGE y análisis por transferencia de tipo Southern tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1. Los resultados mostraron que 6-23 YAC permaneció intacto y las cepas estaban listas para aparearse con un clon L1 de YAC.

Se analizó adicionalmente el clon 6-23 para determinar la resistencia a canavanina (CAN) y cicloheximida (CYH), se usó para la selección de haploides tras apareamiento con un clon que porta L1 YAC y esporulación. Véase Birren *et al.*, citado anteriormente, vol. 3, págs. 495-501.

Introducción de bcl-a en pYAC-5'

Con el fin de determinar el número de copias de YAC de λ de inmunoglobulina tras la introducción en células ES y en la línea germinal de ratones transgénicos, también se clonó en pYAC-5' un gen de bcl-a truncado. Se obtuvo el gen mediante amplificación por PCR de ADN de ratón usando un primer cebador de secuencia 5'-GGG GTA TTT GTG GAA TTA CTT-3' y un segundo primer de secuencia 5'-CCC ATC TGG ATT TCT AAG TGA-3'. Luego se clonó el producto amplificado por PCR en el vector de clonación pCR2.1. Luego se digirió el plásmido que contenía el gen de bcl-a con Nsil, se descartó el fragmento Nsil-Nsil, y volvió a ligarse el plásmido para crear una secuencia de bcl-a de 173 pb. Se determinó la orientación del gen de bcl-a truncado en pCR2.1 mediante análisis de digestos de restricción.

Se digirió el plásmido resultante con BamHI, se rellenaron los extremos con fragmento Klenow y se digirieron con ApaI. Se aisló el fragmento de bcl-a de 170 pb y se clonó en los sitios NruI y ApaI del vector pYAC-5' tal como se describe en el ejemplo 2 anterior.

Introducción de HPRT en L1 YAC

Las fusiones de células ES de animales no humanos con esferoplastos de levadura que portan los YAC para crear células ES que portan loci de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana se facilitan mediante los YAC que contienen un marcador seleccionable de mamífero, por ejemplo, HPRT, para la selección en las células ES negativas para función de HPRT endógena. Por tanto, para producir un YAC que soportará la detección eficaz de la introducción de un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana en una célula ES de ratón, se construyó un vector de direccionamiento para introducir HPRT en L1 YAC. La estrategia elegida también da como resultado el acortamiento de L1 YAC mediante el direccionamiento de una región de aproximadamente 22 kb directamente en el sentido de 5' del gen de V_{λ} en 5', V_{λ} 1-27. Se digirió parcialmente el plásmido pREP (Mendez *et al.*, *Genomics* 26: 294-307 (1995)) que contenía los marcadores seleccionables ADE y HPRT, con Bam HI, se rellenaron las proyecciones con fragmento Klenow para crear extremos romos y volvieron a ligarse. Se determinó el sitio BamHI que se eliminó mediante una digestión con BamHI y NotI. Se clonaron los genes de ADE2 y HPRT como un casete BamHI/NotI en los sitios pYAC-5'BamHI/NruI.

A continuación, se amplificó un producto de PCR de 950 pb desde la región 5' de V_{λ} 1-27 de L1 YAC. Se amplificó esta secuencia mediante PCR usando un cebador 5' que tiene la secuencia 5'-CGG ACC GCA GAG TGA GCC AAG ATT GTA-3' y que tiene un sitio RsrII, y un cebador 3' de secuencia 5'-GGC CGG CCT GTG CTG CTG GAT GCT GTT-3' y que tiene un sitio FseI. Se clonó este fragmento en los sitios RsrII y FseI del plásmido pYAC-5'. Luego se linealizó el vector con NotI y se transformó en levaduras que contenían L1 YAC mediante transformación con LiAc. Se sembraron las células de levadura transformadas en placas SC-ADE para seleccionar el YAC dirigido.

Se recogieron las colonias y se analizaron los YAC en clones de levadura mediante PFGE y análisis por transferencia de tipo Southern tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1. Se encontró que el contenido de genes de V_{λ} , J_{λ} y C_{λ} era idéntico al del L1 YAC original como anteriormente.

Producción de YAC que comprende locus de cadena ligera λ completo

Se generó un YAC que contenía el locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina de línea germinal humana completo mediante apareamiento de la cepa 6-23 con un clon de levadura que comprende L1 YAC que contiene HPRT y bcl-a, tal como se describió anteriormente. Se sembraron las células de levadura en placas SC-HIS-LYS-ADE para eliminar los haploides, y se recogieron los clones y se analizaron mediante PFGE y análisis por transferencia de tipo Southern tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1. Los análisis revelaron que estaban presentes ambos YAC y se confirmó que estaban presentes todos los elementos de genes de λ . Para inducir meiosis para la generación de un YAC que comprende el locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana completo, se hicieron crecer los diploides en placas de esporulación y luego se transfirieron a placas SC-ADE-LYS+CYH+CAN. Véase Birren *et al.*, citado anteriormente, vol. 3, pg. 495.

Se recogieron los clones y se analizaron mediante PFGE y análisis por transferencia de tipo Southern tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1. Se identificó un YAC que contenía todo el locus de cadena ligera λ humana en la configuración de línea germinal y se designó como λ L. Cuando se hicieron crecer 20 clones en medios ricos (YPDA) y en medios de selección (SC-ADE-LYS), no se observó inestabilidad.

EJEMPLO 3: Producción de ratones que portan un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana heredable

Se produjeron esferoplastos de los clones de levadura usando Zymolyase 20T (1,5 mg ml⁻¹) y luego se fusionaron con células 3B1 y ES para crear fusiones de células ES/de levadura (ESY) tal como se describe, por ejemplo, en Jakobovits *et al.*, Nature 362: 255-8 (1993) y el documento WO98/24893, que se incorporan ambos al presente documento como referencia. Se seleccionaron células con medio HAT comenzando 48 horas después de la fusión. Se recogieron los clones y se expandieron. Luego se analizaron las líneas celulares ES mediante transferencia de tipo Southern para determinar la presencia e integridad de YAC de λ de Ig humana, usando sondas que abarcan el YAC creado en el ejemplo 2 anterior.

Se encontró que siete líneas celulares ES contenían el YAC de λ de Ig humana intacto. Se expandieron clones de células ESY positivos y se microinyectaron en blastocistos de ratón apropiados, por ejemplo, C57BL/6J, usando técnicas bien conocidas en la técnica. Se colocaron los blastocistos microinyectados en el útero de madres adoptivas C57BL/6 con embarazo simulado. Se identificaron los animales quiméricos mediante el color del pelaje. Se aparearon los ratones quiméricos con hembras C57B6. Se detectó la transmisión de línea germinal del genoma de células ES mediante el color del pelaje de la progenie resultante. Las crías con un color del pelaje de agutí era indicativas de transmisión de línea germinal del genoma de células ES, mientras que las crías con un color del pelaje negro no han transmitido el genoma de células ES.

Se analizó la progenie de color de agutí de los ratones quiméricos para determinar la presencia de YAC de λ de Ig humana en sus genomas. Se realizó una biopsia de la cola de las crías de agutí, se recuperó el ADN usando técnicas convencionales y se analizó el ADN resultante mediante PCR para determinar la presencia de ADN de λ de Ig humana. Se analizan las crías transgénicas para determinar la posesión e integridad de un transgén de λ de Ig humana intacto mediante análisis por transferencia de tipo Southern usando las sondas descritas en el ejemplo 1.

EJEMPLO 4: Producción de ratones transgénicos que comprenden genes de cadena pesada y cadena ligera κ y λ de inmunoglobulina humana

Para crear ratones transgénicos que comprenden genes de cadena pesada, cadena ligera κ y cadena ligera λ de inmunoglobulina humana así como genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena sustancialmente inactivados, se aparearon los ratones transgénicos creados mediante los métodos descritos en el ejemplo 3 con ratones que comprenden genes cadena pesada y genes de cadena ligera κ de inmunoglobulina humana, y que tienen genes de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina endógena sustancialmente inactivados. Los ratones que pueden usarse incluyen la cepa I de Xenomouse (véase, por ejemplo, Green *et al.*, Nature Genetics 7: 13-21, 1994 y el documento WO 98/24893), la cepa L6 (véase, por ejemplo, el documento WO 98/24893), la cepa II de Xenomouse (véase, por ejemplo, el documento WO 98/24893) y ratones que comprenden una región de cambio no relacionada (véase, por ejemplo, el documento WO 00/76310). Véanse también las patentes estadounidenses 5.939.598 y 6.162.963. Los ratones de la generación F1 comprendían una camada de genotipos mixtos. Se realizaron apareamientos adicionales para obtener el genotipo deseado. Los ratones transgénicos que comprenden genes de cadena pesada, ligera κ y ligera λ de inmunoglobulina humana se han designado como Xenomouse-KL. Los ratones transgénicos que comprenden genes de cadena pesada y ligera λ de inmunoglobulina humana se han designado como Xenomouse-L.

Alternativamente, se fusionan esferoplastos que portan el YAC creado en el ejemplo 2 anterior con células ES derivadas de ratones que comprenden genes de cadena pesada y cadena ligera κ de inmunoglobulina humana y/o genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena sustancialmente inactivados. Estas células ES pueden derivarse de las cepas de Xenomouse® o la cepa DI (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses 5.939.598 y 6.162.963 y el documento WO 98/24893) que se incorporan al presente documento como referencia. Luego se inyectan las células ESY resultantes en blastocistos, se implantan en ratonas con embarazo simulado, y se

llevan a término tal como se describe en el ejemplo 3.

EJEMPLO 5: Producción de ratones transgénicos que comprenden genes de cadena pesada y cadena ligera λ de inmunoglobulina humana

Se producen ratones transgénicos que comprenden genes de cadena pesada y cadena ligera λ de inmunoglobulina humana, un gen de cadena κ o λ de ratón intacto, y genes de cadena pesada y ligera κ o λ de inmunoglobulina endógena sustancialmente inactivados. Los ratones transgénicos creados mediante los métodos descritos en el ejemplo 3 se aparean con ratones que comprenden genes de cadena pesada de inmunoglobulina humana y genes de cadena pesada de inmunoglobulina endógena sustancialmente inactivados. Se describen estos ratones, por ejemplo, en las patentes estadounidenses 5.939.598 y 6.162.963. Los ratones de la generación F_1 comprenderán una camada de genotipos mixtos. Pueden realizarse apareamientos adicionales para obtener el genotipo deseado.

Alternativamente, se fusionan esferoplastos que portan el YAC creado en el ejemplo 2 anterior con células ES derivadas de ratones que comprenden genes de cadena pesada de inmunoglobulina humana así como genes de cadena pesada y cadena ligera κ o λ de inmunoglobulina endógena sustancialmente inactivados. Luego se inyectan las células ESY resultantes en blastocistos, se implantan en ratonas con embarazo simulado, y se llevan a término tal como se describe en el ejemplo 3.

EJEMPLO 6: Desarrollo de células B y producción de anticuerpos humanos por ratones XenoMouse-KL

Para caracterizar adicionalmente ratones transgénicos XenoMouse-KL, se aíslan linfocitos de bazo y sangre periférica de ratones de 8-10 semanas de edad y controles. Se purifican las células en Lympholyte M (Accurate) (San Diego, CA) y se tratan con anticuerpo anti-receptor de Fc CD32/CD16 de ratón purificado (PharMingen, n.º 553142) (San Diego, CA) para bloquear la unión no específica a receptores de Fc. A continuación, se tiñen las células con diversos anticuerpos y se analizan en un aparato FACS Vantage (Becton Dickinson, software CELLQuest). El panel de anticuerpos que se usan para teñir células de XenoMouse-KL incluyen: anticuerpo de rata anti-CD19 de ratón marcado con Cy-5 (Caltag, n.º RM7706); anticuerpo anti-IgM humana marcado con FITC (PharMingen, n.º 555782); anticuerpo anti-IgM humana marcado con PE (PharMingen n.º 34155X); anticuerpo anti-Ig λ humana marcado con FITC, (PharMingen n.º 555796); anticuerpo anti-Ig κ humana marcado con PE (PharMingen n.º 555792), anticuerpo anti-Ig λ humana marcado con FITC, (PharMingen, n.º 553434).

Para la tinción de ratones 129xB6 de tipo silvestre de control, los anticuerpos usados incluyeron un anticuerpo de rata anti-CD 19 de ratón marcado con Cy-5 (Caltag, n.º RM7706); anticuerpo anti-IgM de ratón marcado con FITC (PharMingen n.º 553408); anticuerpo anti- κ de ratón-FITC (PharMingen n.º 550003); anticuerpo anti-IgM de ratón-PE (PharMingen n.º 553409); anticuerpo anti- κ de ratón-PE (PharMingen n.º 559940).

Se evaluaron linfocitos de bazo y ganglios linfáticos de uno a cuatro animales de las cepas G1 de XenoMouse y G2 de XenoMouse que producen tanto cadenas λ como κ humanas y se compararon con G1 de XenoMouse y G2 de XenoMouse que producen solamente cadenas κ y ratones B6/129 de tipo silvestre usando citometría de flujo. Las cepas de XenoMouse que producen tanto cadenas λ como κ humanas eran XMG2-KL y XMG1-KL, que producen IgG2 humana e IgG1 humana, respectivamente. Los ratones XMG2-KL y XMG1-KL mostraron una reconstitución eficaz en el compartimento de células B y una expresión sustancial de cadenas λ de Ig humana. Tal como se observa en el ser humano, la expresión de Ig κ humana predomina con respecto a Ig λ humana. En las cepas de XenoMouse que expresan tanto Ig κ humana como Ig λ humana, la razón de Ig κ humana con respecto a Ig λ humana, era de aproximadamente 60:40, tal como se observa en seres humanos. Por tanto, los ratones transgénicos que comprenden genes de cadena pesada, ligera κ y ligera λ de inmunoglobulina humana muestran un desarrollo significativo de anticuerpos humanos y el sistema inmunitario.

EJEMPLO 7: Niveles en suero de anticuerpos humanos en ratones no inmunizados

Se lleva a cabo un ELISA para la determinación de anticuerpos humanos en suero de ratón no inmunizado. Para información y procedimientos más detallados sobre los inmunoensayos, véase E. Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, capítulo 14, "Immunoassay", páginas 553-614, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1988).

Se determina la concentración de inmunoglobulinas humanas usando los siguientes anticuerpos de captura: anticuerpo de cabra anti-IgG humana (Caltag, H10500), anticuerpo de cabra anti-Ig κ humana (Southern Biotechnology, 2060-01), anticuerpo de cabra anti-IgM humana (Southern Biotechnology, 2020-01), anticuerpo de cabra anti-Ig λ humana (Caltag, H16500) para Ig γ , κ , μ y λ humana, respectivamente, y anticuerpo de cabra anti- λ de ratón (Southern Biotechnology, 1060-01) para la captura de Ig de λ de ratón.

Los anticuerpos de detección usados en experimentos de ELISA fueron anticuerpo de cabra anti-Ig λ de ratón-peroxidasa del rábano (HRP) (Caltag, M-33607), anticuerpo de cabra anti-IgG humana-HRP (Caltag, H10507), anticuerpo de ratón anti-IgM humana-HRP (Southern Biotechnology, 9020-05), anticuerpo de cabra anti- κ humana-HRP (Southern Biotechnology, 2060-05), anticuerpo de cabra anti-Ig λ humana-HRP (Southern Biotechnology, 2070-

05). Los patrones usados para la cuantificación de Ig humana y de ratón fueron: IgG₂ humana (Abgenix, hIgG2), IgG_{2λ} humana (Abgenix, hIgG2/k), IgG_{2κ} humana (Sigma, 1-4264), IgM_κ humana (Caltag, 13000), IgM_λ humana (Caltag, 13200) e IgG_{2aλ} de ratón (Sigma, M-6034).

5 Se detectó una expresión significativa de cadenas de Igλ humanas en el suero de G1 de Xenomouse y G2 de Xenomouse que producen tanto Igκ humana como Igλ humana. Se detectaron los anticuerpos IgG_{2λ} e IgG1λ completamente humanos. Véase la figura 5.

EJEMPLO 8: Producción de anticuerpos monoclonales humanos

Inmunización y generación de hibridomas

10 Se inmunizaron grupos de cuatro Xenomice G2-κ/λ de 6 semanas de edad por vía subcutánea en la almohadilla de la pata con 10 μg de o bien MCP-1 humana recombinante o bien 10⁷ células CEM humanas. Se inmunizaron grupos de cuatro Xenomice G1-κ/λ de 6 semanas de edad por vía subcutánea en la almohadilla de la pata con 10 μg de MN-Fc recombinante. Se emulsionó el antígeno en Titermax Gold (Sigma; n.º de cat. T2684) para la inmunización primaria y en alumbre (adyuvante de gel de fosfato de aluminio; Superfos Biosector a/s, distribuido por E. M. Sargent Pulp and Chemical Co., Clifton, NJ, n.º de cat. 1452-250) para las inmunizaciones adicionales siguiendo técnicas convencionales, tales como las descritas en Harlow *et al.*, citado anteriormente, páginas 53-138. Se llevaron a cabo las inmunizaciones dos veces a la semana durante tres semanas para al menos 5 inmunizaciones de refuerzo (refuerzos).

20 Los ratones reciben una inyección final de antígeno o células en solución salina tamponada con fosfato (PBS) cuatro días antes de la fusión de los linfocitos de los ganglios linfáticos de drenaje y células de mieloma. Se lleva a cabo el aislamiento de las células linfocíticas de bazo y la posterior fusión siguiendo técnicas convencionales, tales como las descritas en Harlow *et al.*, citado anteriormente, páginas 139-244.

25 Alternativamente, puede llevarse a cabo electrofusión celular. Se prepararon linfocitos de ganglios linfáticos para electrofusión celular enriqueciendo en primer lugar para células B a través de reducción de células T usando una columna magnética. Se añadieron 0,9 ml de DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, JRH Biosciences, n.º de cat. 51444-79P, más glucosa 4500 mg/l, piruvato de sodio 110 mg/l, sin L-glutamina) por 100 millones de linfocitos al sedimento celular. Se resuspendieron las células suavemente pero por completo. Se añadieron 100 μl de perlas magnéticas CD90+ (perlas magnéticas CD90+ de ratón, Miltenyi Biotech, n.º de cat. 491-01) por 100 millones de células, y se mezclaron suavemente y bien. Se incubaron las células con las perlas magnéticas a 4°C durante 15 minutos. Durante la incubación, se lavó previamente la columna magnética con 3 ml de DMEM. Después de la incubación durante 15 min, se pipeteó la suspensión celular marcada de manera magnética que contenía hasta 10⁸ células positivas (o hasta 2x10⁹ células totales) sobre la columna LS+ (Miltenyi Biotech, n.º de cat. 424-01). Se permitió que discurriese la suspensión celular y se recogió el efluente como la fracción negativa para CD90. Se lavó la columna con 3 x 3 ml de DMEM y se recogió el efluente total como la fracción negativa para CD90 (la mayor parte de estas células eran células B).

35 Se fusionaron los linfocitos enriquecidos para células B mediante electrofusión celular con el mieloma P3-X63-Ag8.653 y se sometieron a selección con hipoxantina/azaserina (HA) (Sigma, n.º de cat. A9666). Para las electrofusiones celulares, se recogieron células de mieloma mediante centrifugación en un tubo para centrifuga estéril (un tubo de o bien 50 ml o bien 250 ml, basándose en el número de células recogidas), y se resuspendieron en DMEM. Se combinaron células de mieloma y células B en una razón 1:1 y se mezclaron bien en un tubo cónico de 50 ml. Se sedimentaron las células mediante centrifugación. Se añadieron 2-4 ml de disolución Pronase (CalBiochem, n.º de cat. 53702; 0,5 mg/ml en PBS) y se resuspendió suavemente el sedimento celular. Se procedió con el tratamiento enzimático durante no más de 2 minutos y se detuvo la reacción añadiendo 3-5 ml de suero bovino fetal. Se añadió disolución para electrofusión celular (ECF) (sacarosa 0,3 M, (Sigma, n.º de cat. S7903), acetato de magnesio 0,1 mM (Sigma, n.º de cat. M2545), acetato de calcio 0,1 mM (Sigma, n.º de cat. C4705), se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros) para producir un volumen total de 40 ml y se sedimentaron las células mediante centrifugación. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células suavemente en un pequeño volumen de disolución ECF, luego se añadió más disolución ECF hasta un volumen total de 40 ml. Se mezclaron las células, se contaron y se sedimentaron mediante centrifugación. Se resuspendió el sedimento celular en un pequeño volumen de disolución ECF para ajustar la concentración a 2x10⁶ células/ml.

50 El electrogenerador celular era el modelo ECM2001, Genetronic, Inc., (San Diego, CA). Se usó un sistema de cámara de electrofusión celular de 2 ml para las fusiones. Las condiciones de electrofusión celular fueron:

Condición de alineación: tensión = 50 V, tiempo = 50 s

Rotura de membrana: tensión = 3000 V, tiempo = 30 microsegundos

Tiempo de espera tras la fusión: 3 s

55 Después de la electrofusión celular, se retiró la suspensión celular cuidadosamente en condiciones estériles de la cámara de fusión y se transfirió a un tubo estéril que contenía el mismo volumen (o más) de medio de hibridoma y se

incubó durante 15-30 minutos en un incubador a 37°C. Se sedimentaron las células mediante centrifugación. Se resuspendieron las células en un pequeño volumen de medio HA con una concentración de $\frac{1}{2}$ suavemente y de manera meticulosa y se ajustó al volumen apropiado con medio HA $\frac{1}{2}$ de modo que se sembraran en placa 5×10^6 células B por placa de 96 pocillos y un volumen de 200 μ l por pocillo. Se pipetearon las células en placas de 96 pocillos. El día 7 ó 10, se retiran 100 μ l de medio de cada pocillo y se reemplazan por 100 μ l de medio HA. Alternativamente, pueden fusionarse linfocitos con células de mieloma mediante fusión con polietilenglicol y someterse a selección con HAT tal como se describió previamente [G. Galfre, *et al.*, *Methods Enzymol.* 73: 3-46 (1981)].

Después de 10-14 días de cultivo, se examinaron sobrenadantes con hibridomas para determinar anticuerpos monoclonales específicos de antígeno IgG2 κ , IgG2 λ . En resumen, se recubrieron placas para ELISA (Fisher, n.º de cat. 12-565-136) con 50 μ l/pocillo de CD147-Fc (2 ug/ml, para el grupo de CEM), MCP-1 (2 ug/ml) y MN-his (2 ug/ml) en tampón de recubrimiento (tampón carbonato 0,1 M, pH 9,6, NaHCO₃) y se incubaron a 4°C durante la noche. Después de la incubación, se lavaron las placas con tampón de lavado (Tween 20 al 0,05% en PBS) 3 veces. Se le añadieron a cada pocillo 200 μ l/pocillo de tampón de bloqueo (BSA al 0,5%, Tween 20 al 0,1%, Thimerosal al 0,01% en 1x PBS) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación, se lavó la placa con tampón de lavado 3 veces. Entonces, se añadieron a cada placa 50 μ l/pocillo de sobrenadantes de cultivo con hibridomas, controles positivos, negativos y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la incubación, se lavó la placa con tampón de lavado 3 veces. Luego, se le añadieron a cada placa 100 μ l/pocillo de anticuerpo de detección GT anti-hulgGfc-HRP (Caltag, n.º de cat. H10507), y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación, se lavaron las placas con tampón de lavado 3 veces. Luego se le añadieron a cada placa 100 μ l/pocillo de disolución de desarrollo (10 ml de tampón de sustrato, 1 mg de OPD (o-fenilendiamina, n.º de cat. de Sigma P-7288), 10 μ l de H₂O₂ al 30% (Sigma)), preparando la disolución de nuevo antes de su uso. Se permitió que se desarrollase la reacción durante aproximadamente 10 minutos (hasta que los pocillos de control apenas empiezan a mostrar color), luego se añadieron 50 μ l/pocillo de disolución de detención (H₂SO₄ 2 M). Se leyeron los valores de DO en un lector de placas para ELISA a la longitud de onda de 492 nm.

Para exámenes secundarios, para determinar el uso de cadena ligera de Ig, se examinaron 3 conjuntos de muestras que representaban los pocillos positivos en el primer examen, un conjunto para la detección de hIgHG, un conjunto para la detección de h κ y un conjunto para la detección de h λ . Los anticuerpos de detección fueron GT anti-hIg κ -HRP (Southern Biotechnology, n.º de cat. 2060-05) y GT anti-hIg λ (Southern Biotechnology, n.º de cat. 2070-05) en el examen secundario.

Las cepas de Xenomouse-KL produjeron anticuerpos monoclonales IgG λ completamente humanos. Para los inmunógenos, células CEM y proteína MCP-1, se obtuvieron anticuerpos monoclonales específicos de antígeno IgG2 κ e IgG1 λ ambas totalmente humanas a partir de los ratones Xenomouse G2-KL. Para la proteína de fusión recombinante MN-FC, se obtuvo un AcM, IgG1 λ completamente humana, a partir de los ratones Xenomouse G1-KL.

EJEMPLO 9: Caracterización de la integración de YAC en cadena ligera λ humana

Se preparó ADN genómico a partir de las líneas celulares ES y 3B1 mediante extracción con fenol/cloroformo según el método de Gross-Bellard *et al.* (Gross-Bellard, M., Oudet, P., y Chambon, P., *Isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells* Eur. J. Biochem. 36: 32-38, 1973). Se extrajo ADN genómico de cepas de Xenomouse a partir de cortes en la cola usando el kit para tejido QIAGEN DNeasy 96 (n.º de cat. de Qiagen 69582). Se digirieron 10 μ g de cada muestra con EcoRI (para la hibridación con sondas de V λ), PvuII y PstI (para sondas de C λ) y SacI (para sondas de potenciador en 3' de λ). Se hicieron correr las muestras de ADN digeridas por un gel de agarosa al 0,7% (SEAKEM ME, FMC) en tampón 0,5 X Tris/borato/EDTA (TBE), durante 16 horas. Se transfirió el ADN a una membrana de nailon GENESCREEN (NEN Life Science) mediante transferencia alcalina convencional. Se radiomarcaron las sondas de ADN, descritas a continuación, usando el kit High Prime (n.º de cat. de Roche 1 585 592). Se realizó la hibridación a 65°C durante 1 hora. Se realizaron lavados de baja rigurosidad a 65°C usando disolución de SDS al 0,1%, 1XSSC durante 1 hora. Se realizaron dos lavados de alta rigurosidad en SDS al 0,1%, 0,1XSSC a 65°C. Se expusieron las membranas lavadas, a -70°C a película de rayos X (Eastman Kodak, Rochester, NY) con un refuerzo de una pantalla intensificadora.

Las sondas específicas de la familia de V λ usadas para detectar genes humanos de V λ fueron V λ 2a2, V λ 3P, V λ 5c, V λ 7a y V λ 8a, C λ y potenciador en 3' de λ . Las sondas de V λ y C λ sondas se han descrito previamente (Pripiat *et al.*, *Organization of the human immunoglobulin λ light-chain locus on chromosome 22q11.2*. Hum. Mol. Genet. 4, 983-991, 1995; Udey, J. A. y Blomberg, B., *human λ light chain locus: Organization and DNA sequences from three genomic J regions*. Immunogenetics 25: 63). Se amplificó la sonda de potenciador en 3' de λ de 450 pb a partir de ADN genómico humano, usando el cebador directo 5'-GATAAGAGTCCCTCCCCACA-3' y el cebador inverso 5'-GGCCATGAGCTCAGTTTCTC-3'.

Se determinó la organización del locus de cadena ligera lambda de inmunoglobulina humana en Xenomouse mediante hibridación por transferencia de tipo Southern. Se determinó la integridad de V λ y C λ en Xenomouse mediante hibridación por transferencia de tipo Southern del ADN digerido con EcoRI, se hibridó con varios

segmentos específicos de la familia de $V\lambda$ o $C\lambda$ diferentes ubicados dentro de cinco agrupaciones ricas en genes. Véanse las figuras 6A-G. También se determinó la presencia de la región potenciadora en 3' de λ (datos no mostrados). Se compararon los patrones de hibridación de todas las sondas de $V\lambda$ y $C\lambda$ con el del ADN genómico humano y el del YAC de λ . Los análisis por transferencia de tipo Southern revelaron que cada uno de los genes de $V\lambda$ identificados en ADN genómico humano está presente en el YAC de λ integrado en células ES y en ADN genómico extraído de las colas de tres cepas de Xenomouse.

Específicamente, se extrajo ADN genómico humano, se extrajo ADN genómico de las cepas de Xenomouse G4 3C1L3, G2 XMG2L3 y G1 3B3L3 y se extrajo ADN genómico de la línea celular ES V8.5A y se digirieron con EcoRI (figuras 6A-D), con PstI (figura 6E) o PvuII (figura 6F) tal como se describió anteriormente. Como control positivo, se añadió 1 μ g de YAC de λ a 10 μ g del ADN genómico de 3B1, que es un ratón que no contiene el locus λ humano, y se digirió con las mismas enzimas. Como control negativo, se digirieron 10 μ g del ADN genómico de 3B1 con las mismas enzimas. Se sometieron estas muestras a análisis por transferencia de tipo Southern tal como se describió anteriormente. Las sondas usadas fueron las siguientes: para $V\lambda 2$, la sonda $V\lambda 2a2$ (figura 6A); para $V\lambda 3$, la sonda $V\lambda 3p$ (figura 6B); para $V\lambda 5$, la sonda $V\lambda 5C$ (figura 6C); para $V\lambda 7$, la sonda $V\lambda 7a$ (figura 6D); para $V\lambda 8$, la sonda $V\lambda 8a$ (figura 6E); y para $C\lambda$, las sondas de $C\lambda$ descritas anteriormente. El análisis por transferencia de tipo Southern del ADN digerido con EcoRI, PstI o PvuII mostró un patrón uniforme de bandas de hibridación para todas las muestras analizadas. Véanse las figuras 6A-G. La presencia de bandas de hibridación idénticas para $V\lambda$, $C\lambda$ y el potenciador en 3' de λ confirmó que YAC de λ integrado en cepas de Xenomouse abarca todo el locus. En las tres cepas de Xenomouse sometidas a prueba, se transmitió el YAC sin deleciones o reorganizaciones evidentes. Además, el patrón de hibridación usando la sonda $V\lambda 3$ detecta la mayor familia de $V\lambda III$, que se compone de diez segmentos V funcionales y 13 pseudogenes. Por tanto, el análisis por transferencia de tipo Southern indica que 1 Mb de todo el locus del gen de $HuI\gamma$ YAC contiene genes de $V\lambda$, siete segmentos $J\lambda$ - $C\lambda$ emparejados, y el potenciador de λ en 3' en la configuración de línea germinal correcta.

EJEMPLO 10: Uso de $Ig\lambda$ en una respuesta de anticuerpos

Se inmunizaron Xenomice KL con diversos antígenos. Se caracterizaron los anticuerpos que se produjeron por los Xenomice para determinar qué anticuerpos tenían una cadena ligera κ y cuáles tenían una cadena ligera λ . Se esperaba que la razón de cadena ligera κ con respecto a cadena ligera λ en los diversos anticuerpos producidos fuese de aproximadamente 60:40 en los anticuerpos producidos por los Xenomice porque aproximadamente el 40% de los anticuerpos comprenden cadenas ligeras λ y el 60% de los anticuerpos comprenden cadenas ligeras κ en seres humanos. Sorprendentemente, para algunos antígenos y cepas de Xenomice, $Ig\lambda$ dominó en algunas respuestas inmunitarias. Véase la tabla 3 (las respuestas dominantes de $Ig\lambda$ aparecen en negrita).

Tabla 3

Ag (kD)	$\kappa:\lambda$ (%)		
	XMG1	XMG2	XMG4
8	50:50	60:40	--
17,2	60:40	40:60	--
17	60:40	60:40	50:50
9	--	30:70	20:80
104	--	60:40	50:50
2	20:80	50:50	50:50
26	30:70	--	30:70
KLH	90:10	90:10	--

Lista de secuencias

- <110> Amgen Fremont Inc.
- 35 <120> ANIMALES TRANSGÉNICOS QUE PORTAN GENES DE CADENA LIGERA DE Ig LAMBDA HUMANA
- <130> K2099 EP/1 S3
- <140> Documento PCT/US02/38245
- <141> 27-11-2002
- <150> Documento 60/334.508
- 40 <151> 30-11-2001
- <160> 17
- <170> Patentin Ver. 3.2

	<210> 1	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 1	
	gggaccgcct catttgttgt cagatcatg	29
	<210> 2	
10	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
15	<400> 2	
	ggccggccag cagaatacat gttatctt	28
	<210> 3	
	<211> 35	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 3	
	ggccatcgga cgtcgcgaa tcgatggccg gccgc	35
25	<210> 4	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 4	
	ggccgcggcc ggccatcgat tcgcgacggt ccgat	35
	<210> 5	
	<211> 26	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 5	
	acgcggttgat gagcaaccac aggcct .	26
5	<210> 6	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 6	
	ggcgcggccag tccatcctgg cttccttc	28
	<210> 7	
	<211> 40	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 7	
20	ggccatagat ctggcgggcc tcgcgaatcg atacgcgtgc	40
	<210> 8	
	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 8	
	gatcgcgggcc gcacgcgtat cgattcgcga ggcgcggccag atctat	46
	<210> 9	
30	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
35	<400> 9	
	agtcacatca agatcgttat gg	22

	<210> 10	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 10	
	gcacggaata tgggactact tcg	23
	<210> 11	
10	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
15	<400> 11	
	actccacttc aagtaagagt ttg	23
	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 12	
	ggggtatttg tggaattact t	21
25	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 13	
	cccactcggga tttctaagtg a	21
	<210> 14	
	<211> 27	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 14		
	cggaccgcag agtgagccaa gattgta		27
5	<210> 15		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 15		
	ggccggcctg tgctgctgga tgctggt		27
	<210> 16		
	<211> 20		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 16		
20	gataagagtc cctccccaca		20
	<210> 17		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 17		
	ggccatgagc tcagtttctc		20
30			

REIVINDICACIONES

1. Método de producción de un ratón transgénico que expresa cadenas ligeras Ig- κ humanas y cadenas ligeras Ig- λ humanas, que comprende las etapas de:
 - 5 (A) producir una célula madre embrionaria (ES) de ratón que comprende un locus de cadena ligera λ humana, en la configuración de línea germinal, e integrado de manera estable en el genoma de la célula ES, en el que dicho locus de cadena ligera λ comprende los segmentos de gen de V_λ desde 5' del gen de $V_{\lambda\ 1-27}$ hasta 3' del potenciador de λ en 3';
 - (B) producir un ratón transgénico a partir de la célula ES de la etapa (A); y
 - (C) aparear dicho ratón transgénico de la etapa (B) con un ratón transgénico cuyo genoma comprende:
 - 10 (i) una parte integrada de manera estable de un locus de cadena ligera κ humana en la configuración de línea germinal, en el que dicha parte comprende los genes de V_κ empezando en $V_{\kappa-B3}$ y terminando en $V_{\kappa-OP11}$, con una delección de $V_{\kappa-LP13}$ a $V_{\kappa-LP6}$; la región J_κ ; la región C_κ ; el elemento de delección de κ ; y los potenciadores en 3' e intrónico de $Ig\kappa$; y
 - 15 (ii) una parte integrada de manera estable de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina humana en la configuración de línea germinal, en el que dicha parte comprende los genes de V_H empezando en V_{H6-1} y terminando en V_{H3-65} ; la región D_H , la región J_H , los genes de la región constante C_{μ} , los genes de la región constante C_{δ} , los genes de la región constante C_γ , el potenciador en 3' de ratón y el potenciador intrónico humano,

en el que dichos genes de la región constante C_γ se seleccionan del grupo que consiste en: genes

20 de la región constante $C_\gamma 1$ humana, genes de la región constante $C_\gamma 2$ humana y genes de la región constante $C_\gamma 4$ humana;

 - (iii) loci de cadena pesada de inmunoglobulina endógena inactivados homocigotos; y
 - (iv) loci de cadena ligera κ de inmunoglobulina endógena inactivados homocigotos;

para producir un ratón transgénico como descendencia cuyo genoma comprende:

 - 25 (a) dicho locus de cadena ligera λ humana, en la configuración de línea germinal, e integrado de manera estable;
 - (b) dicha parte integrada de manera estable de un locus de cadena ligera κ humana en la configuración de línea germinal;
 - 30 (c) dicha parte integrada de manera estable de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina humana en la configuración de línea germinal;
 - (d) loci de cadena pesada de inmunoglobulina endógena inactivados homocigotos; y
 - (e) loci de cadena ligera κ de inmunoglobulina endógena inactivados homocigotos.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha célula ES de ratón se produce mediante:
 - 35 (a) combinar en condiciones de fusión:
 - (i) esferoplastos de levadura que tienen incorporado un marcador seleccionable y un YAC que comprende dicho locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana; y
 - (ii) células ES de ratón,

mediante lo cual dicho marcador seleccionable y dicho locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana se incorporan en el genoma de dichas células ES de ratón; y

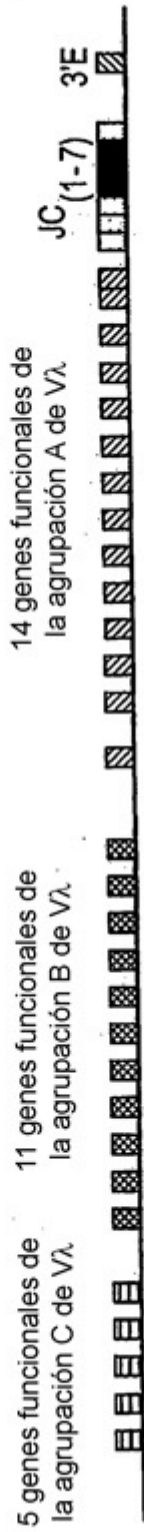
 - 40 (b) seleccionar las células ES de ratón que han incorporado dicho marcador seleccionable y seleccionar de ese modo las células ES de ratón que comprenden dicho locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana.
3. Método según la reivindicación 2, en el que dicho marcador seleccionable es el gen de HPRT, el gen de resistencia a neomicina, el gen de resistencia a higromicina, fl-gal o GPT.
- 45 4. Método de aislamiento de una molécula de ácido nucleico que codifica para una cadena ligera λ humana, una cadena pesada humana, o tanto para una cadena ligera λ humana como para una cadena pesada

humana, de un anticuerpo de Ig- λ humana o una parte del mismo que se une específicamente a un antígeno de interés, en el que dicho método comprende las etapas de:

- 5 (a) proporcionar, a partir de un ratón transgénico, una célula B que produce un anticuerpo de Ig- λ humana que se une específicamente a un antígeno de interés, en el que el genoma de dicho ratón transgénico comprende:
- 10 (i) un locus de cadena ligera λ humana, en la configuración de línea germinal, e integrado de manera estable en el genoma de la célula ES, en el que dicho locus de cadena ligera λ comprende los segmentos de gen de λ desde 5' del gen de $V_{\lambda 1-27}$ hasta 3' del potenciador de λ en 3';
- 15 (ii) una parte integrada de manera estable de un locus de cadena ligera κ humana en la configuración de línea germinal, en el que dicha parte comprende los genes de V_{κ} empezando en $V_{\kappa-B3}$ y terminando en $V_{\kappa-OP11}$, con una delección de $V_{\kappa-LP13}$ a $V_{\kappa-LP6}$; la región J_{κ} ; la región C_{κ} ; el elemento de delección de κ ; y los potenciadores en 3' e intrónico de Ig κ ; y
- 20 (iii) una parte integrada de manera estable de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina humana en la configuración de línea germinal, en el que dicha parte comprende los genes de V_H empezando en V_{H6-1} y terminando en V_{H3-65} : la región D_H , la región J_H , los genes de la región constante C_{μ} , los genes de la región constante C_{δ} , los genes de la región constante C_{γ} , el potenciador en 3' de ratón y el potenciador intrónico humano,
- en el que dichos genes de la región constante C_{γ} se seleccionan del grupo que consiste en: genes de la región constante $C_{\gamma 1}$ humana, genes de la región constante $C_{\gamma 2}$ humana y genes de la región constante $C_{\gamma 4}$ humana;
- (iv) loci de cadena pesada de inmunoglobulina endógena inactivados homocigotos; y
- (v) loci de cadena ligera κ de inmunoglobulina endógena inactivados homocigotos;
- 25 (b) aislar de dicha célula B una molécula de ácido nucleico que codifica para una cadena ligera λ humana, una cadena pesada humana, o tanto para una cadena ligera λ humana como para una cadena pesada humana, del anticuerpo de Ig- λ humana o una parte del mismo.

FIG. 1

El locus de Igλ humana



Reconstrucción del locus de Igλ humana sobre yλ

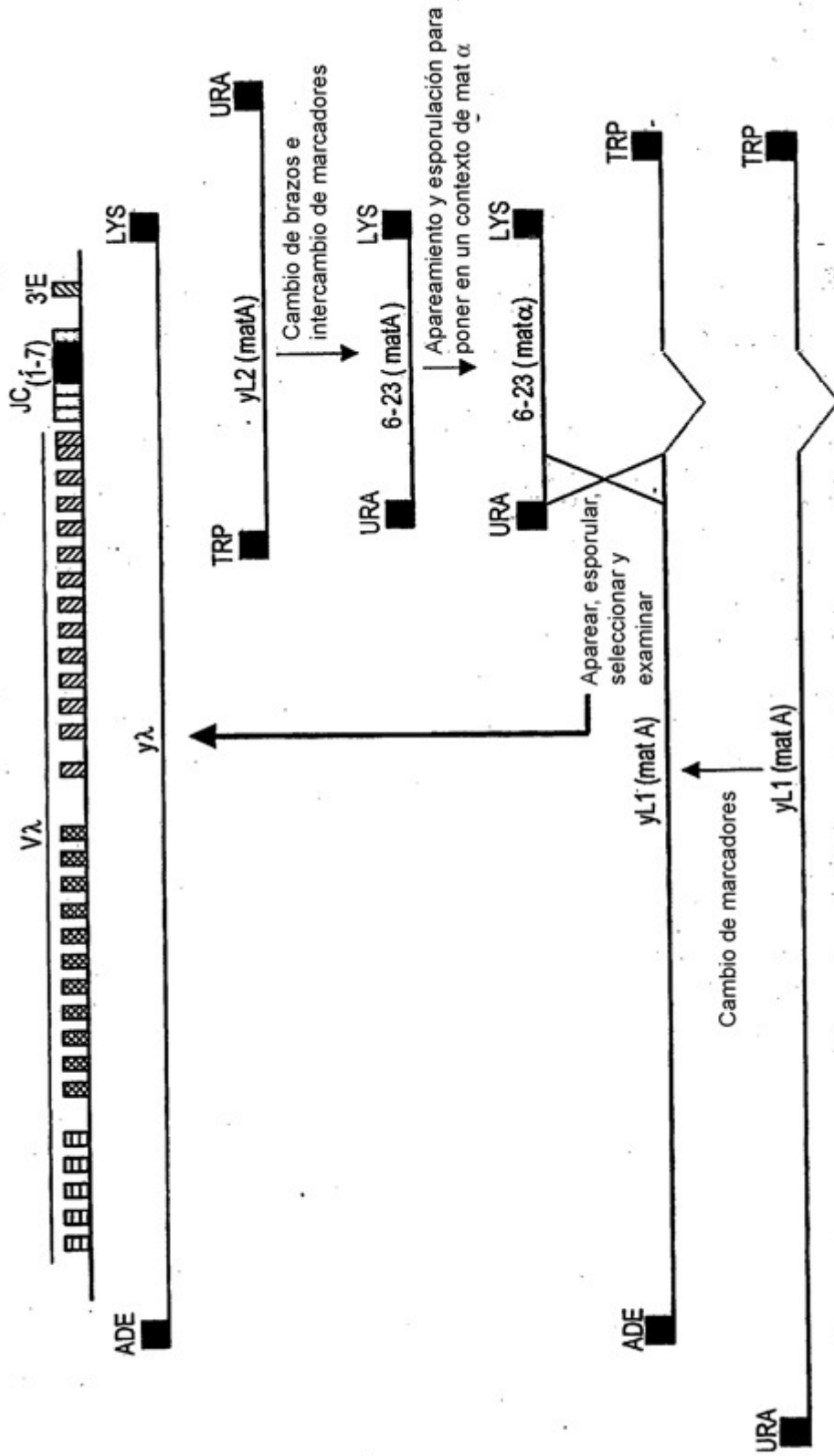


FIG. 2

FIG. 3

Expresión de Igλ humana e Igκ humana en cepas de XenoMouse-KL

Ratón	% de CD19 ⁺	% de μ ⁺ κ ⁺ humana en CD19 ⁺	% de μ ⁺ λ ⁺ humana en CD19 ⁺	% de κ ⁺ en CD19 ⁺	% de λ ⁺ humana en CD19 ⁺	% de λ ⁺ de ratón en CD19 ⁺
Control silvestre	68	no realizado	no realizado	96	no realizado	4
XMG2	75	69	0	69	0	15
XMG2 -KL	75	49	41	47	36	8
XMG1	65	86	0	85	0	13
XMG1 -KL	71	44	31	40	33	9

Resumen de fusión

Diana	N.º de animal/ Cepa	N.º de AcM específicos de antígeno	
MN	4 cada gp		
GP3	XMG1	0	0
GP4	XM3G1-KL	0	1
células CEM	4 cada gp	anti-CD147	anti-CD147
GP1	XMG2	5	0
GP2	XMG2-KL	5	3
MCP-1	4 cada gp		
GP4	XMG2	9	0
GP5	XMG2-KL	12	2

FIG. 4

FIG. 5

Niveles de Ig en suero en ratones Xenomouse-KL no expuestos previamente

ID de ratón	N.º de copias de yK	h _K total	h _λ total	hIgM total	IgM _K total	IgM _λ total	hIgG total	hIgG _K total	hIgG _λ total
F1 129xB6	N.A.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
XMG2	homocigoto	521	ND	279	316	ND	776	272	ND
XMG2-KL	homocigoto	483	1.312	517	292	219	967	220	1.125
XMG1	homocigoto	133	ND	73	73	ND	24	16	ND
XMG1-KL	hemocigoto	129	247	258	83	141	91	41	71

FIG. 6a

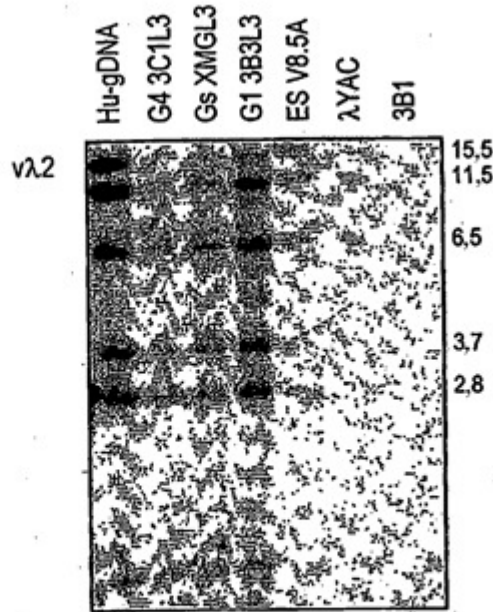


FIG. 6b

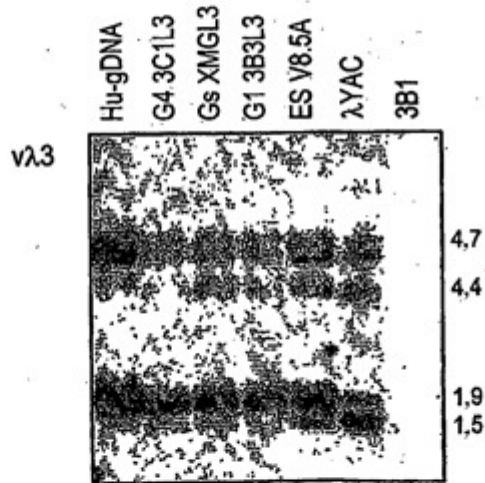


FIG. 6c

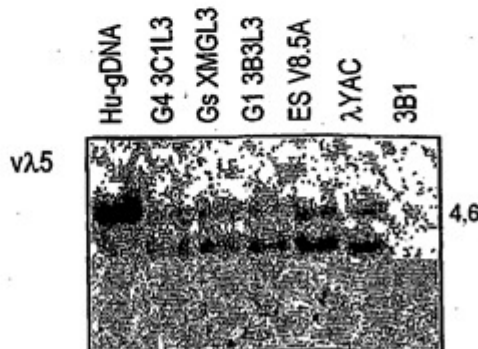


FIG. 6d

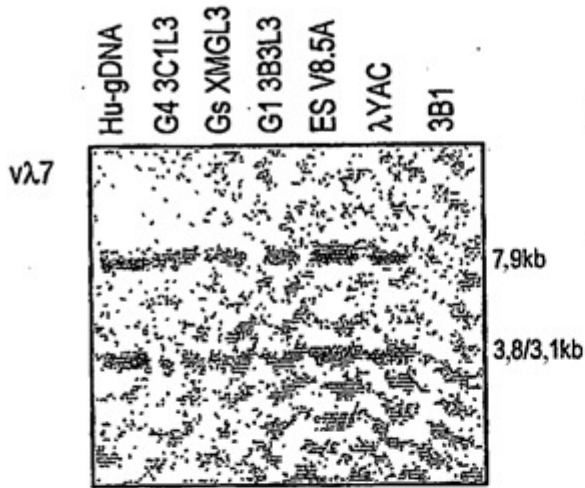


FIG. 6f

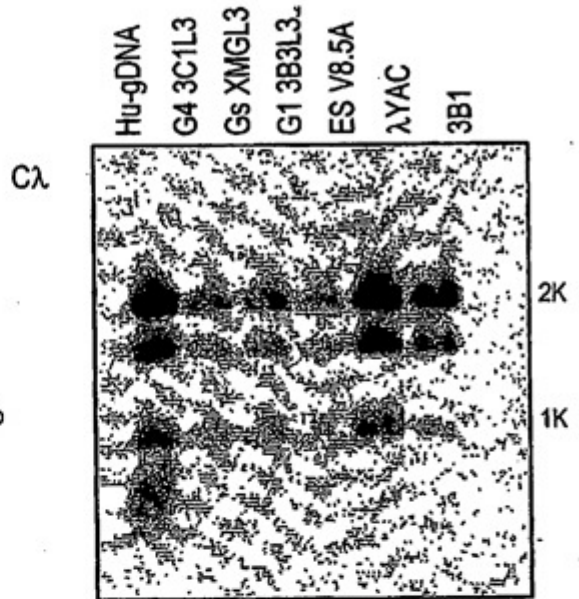


FIG. 6e

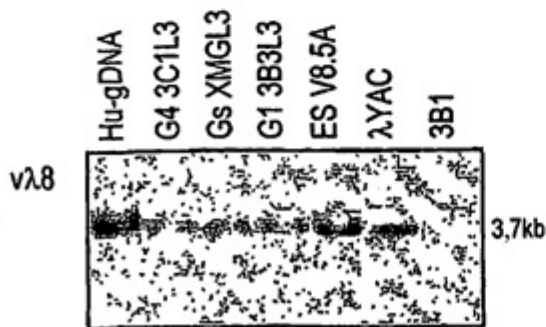


FIG. 6g

